

Thèse

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

SPECIALITE CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

Présentée par

Vanessa BARSOTTI

RECHERCHE ET CARACTERISATION DE MICROORGANISMES DANS DES COMPARTIMENTS GEOLOGIQUES PROFONDS

Soutenue publiquement le 03 novembre 2011 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :	Bernard Ollivier Mohamed Jebbar	Directeur de Recherche, IRD Marseille Professeur, LM2E Brest
Examineurs :	Maurice Pagel Scott Altmann Francis Garrido Claire Sergeant	Professeur, Université d'Orsay Ingénieur ANDRA Chercheur BRGM Chargée de Recherches CNRS, Directeur de thèse
Invitées :	Catherine Joulian Claire Le Hénaff-Le Marrec	Chercheur BRGM Maître de Conférences, IPB Bordeaux



CENBG- Equipe Radioactivité et Environnement
CNRS-IN2P3/Université Bordeaux I UMR5797
Gradignan



Bureau de Recherches Géologiques et Minières
Service Environnement et Procédés Innovants
Unité Biogéochimie Environnementale
Orléans

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre d'Etude Nucléaire de Bordeaux-Gradignan (CENBG) dans l'équipe de Radioactivité et Environnement (RADEN, anciennement Chimie Nucléaire Analytique et Bio-environnementale ou CNAB) et dans l'Unité de BioGéochimie Environnementale (BGE) du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) à Orléans.

Je voudrais remercier en tout premier lieu Philippe Moretto, directeur du CENBG et Bernard Lavielle, responsable de l'équipe de Radioactivité et Environnement et ancien directeur du CNAB, Francis Garrido et Dominique Morin, actuel et ancien responsable de l'unité BGE, ainsi que Hervé Gaboriau et Stéphane Roy, chef et adjoint du service Environnement et Procédés Innovants du BRGM, de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je tiens également à remercier Bernard Ollivier, Mohamed Jebbar, Maurice Pagel et Scott Altmann d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à mon jury de thèse.

Je remercie l'Agence Nationale de Gestion de Déchets Radioactifs (ANDRA) qui a offert l'opportunité d'étudier des échantillons naturels aussi originaux, le Gnr FORPRO pour l'accompagnement financier ayant permis l'achat de matériel au sein du CNAB et le financement de missions ainsi que le CNRS et le BRGM sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour et n'aurait jamais pu aboutir.

Je remercie ensuite ma directrice de thèse, Claire Sergeant, pour la confiance qu'elle m'a accordé et pour avoir assuré le bon déroulement de ce travail.

Je remercie une seconde fois Francis Garrido, co-encadrant de ma thèse au BRGM pour ses conseils, ses encouragements, sa sympathie et pour sa contribution active et régulière au suivi de cette thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement Catherine Jouliau (seconde co-encadrante de thèse au BRGM) pour m'avoir formé et conseillé tout au long de cette thèse. Merci pour ta disponibilité, ton investissement, ton enthousiasme et ton soutien sans faille à la paillasse comme à la rédaction. Pour cela, je t'en suis très reconnaissante.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés dans cette thèse.

Je remercie Jennifer Hellal pour sa collaboration si précieuse et sa sympathie de chaque jour. Merci de m'avoir initié aux traitements statistiques ainsi que de ton aide sur Xcelstat, Endnote et Quantity one. Merci de m'avoir tant appris en si peu de temps ! Merci également pour ton amitié, ton oreille attentive et pour tous les bons moments partagés avec toi dans le bureau et à l'extérieur pendant cette dernière année qui fut riche en émotion.

Je remercie vivement Sébastien Dupraz (alias M'sieur Dup) pour sa confiance, sa disponibilité, sa patience et son investissement dans les derniers mois de ma thèse ainsi que pour ses conseils avisés dans l'élaboration du plan factoriel. Merci de m'avoir fait partager aussi généreusement d'une partie de ton immense savoir qui dépasse tellement la biogéochimie, les réacteurs sous pression, la

psychanalyse, le conte *Dracula* et l'affaire Boulin. Nos discussions laisseront dans ma mémoire un souvenir impérissable...

Merci également à Catherine Crouzet (MMA/BGE, BRGM) pour son soutien technique, Eric Bechu (MMA, BRGM) pour son travail de qualité en matière d'analyses en chromatographie ionique, Benoît Henry (MMA, BRGM) pour les dosages de gaz et sa réactivité ainsi qu'à Véronique Jean-Prost (MMA, BRGM) pour la réalisation des DRX poudres. Je remercie également Philippe Blanc et Catherine Lerouge de l'équipe MIS du BRGM pour leurs aides sur la modélisation de la composition des eaux porales. Catherine, merci d'avoir pris le temps de relire et de corriger la partie plus « géol » de cette thèse. Merci également à Fabienne Battaglia-Brunet (équipe BGE, BRGM) pour sa contribution scientifique et à Claire Le Hénaff-Le Marrec (Université Bordeaux 1) pour m'avoir mis à disposition l'équipement de son laboratoire et m'avoir fait bénéficier de ses compétences.

Je remercie tous les techniciens avec qui j'ai eu la chance de travailler, pour leurs gentillesse et leurs conseils techniques : Stéphanie Coulon, Pierre Galle, Dominique Breeze, Hafida Tris, Pascal Augier et Mickaël Beaulieu.

Merci à toutes les personnes du BRGM et du CENBG que j'ai eu le plaisir de côtoyer et qui ont rendu mon séjour au sein de ces laboratoires particulièrement agréable. Pour le BRGM, je tiens à remercier Caroline Michel ou « la femme chocolat », pour sa gaieté et son accent plein de soleil, Patrick D'Hugue, pour son accueil convivial, Yannick Menard, pour sa gentillesse et sa simplicité, Sandrine Castillot, pour son aide au niveau administratif et tous les autres sans oublier la pétulante Gina. Pour le CENBG, merci à Marie-Hélène Vesvres et à Bertrand Thomas, pour leur disponibilité et leur gentillesse. Marie-Hélène, merci de m'avoir pris sous ton aile quand je suis arrivée au labo. Tu as été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments, merci pour ton amitié. Merci également à ceux que j'ai pu croiser à la machine à café, entre autres Stéphane, Jérôme, Tina, Benoit, Asuncion et beaucoup d'autres pour leur sympathie et leur bonne humeur quotidienne.

Je n'oublie pas les anciens thésards maintenant docteurs avec qui j'ai tissé de forts liens d'amitié : Thomas (bonne route vers les étoiles !), et l'adorable et sensible Sylviane toujours accompagné de son joyeux Johnny (bises à tous les deux et à très vite), aux nouveaux thésards : Fredo, Aude et Djebri (courage pour la suite), à l'ingénieuse Anne (merci pour tes conseils, ta biblio et tes explications) et les nombreux étudiants de passage : Audrey, Rémi, Prince, Christophe ...

Une pensée spéciale pour mes anciens encadrants de Master 2, Valérie Michotey (Université Aix-Marseille 2), Patricia Bonin (LMGEM, Marseille) et Bernard Ollivier (IRD, Marseille) pour m'avoir donné le goût de la recherche ainsi qu'un grand merci à Sophie et à Cédric qui ont fait de ces 6 mois de stage un pur bonheur.

Enfin, je remercie ceux qui me soutiennent depuis toujours ou presque : mes parents, ma sœur, mon frère, ma famille et mes amis. Merci d'avoir su rester présents même à plus de 700 km de distance.

Je ne peux finir ces remerciements sans parler de celui qui m'a supporté et soutenu au quotidien tout au long de cette thèse, qui m'a permis de garder ma santé mentale intacte et à qui je dois mes plus beaux souvenirs. Mica, tu m'as fait le plus merveilleux des cadeaux. Dans un certain sens, cette thèse c'est aussi un peu la tienne.

Valorisation des résultats

Articles soumis ou en préparation

Nèble, S., Poulain, S., **Barsotti, V.**, Vesvres, M.-H., Le Marrec, C. and Sergeant C. Direct DNA extraction from old clay samples. (**soumis à *Journal of Microbiological Method***).

Barsotti, V., Harris-Hellal, J., Sergeant, C., Ollivier, B., Garrido, F. and Joulian, C. Microbial investigation of deep Triassic sandstones: origins of subsurface biodiversity (**en préparation**).

Barsotti, V., Dupraz, S., Battaglia-Brunet, F., Sergeant, C., Garrido, F. and Joulian, C. Combined effects of temperature, pressure and salinity on metabolic activity and growth of anaerobic microorganisms (**en préparation**).

Participations à des conférences nationales et internationales

Barsotti, V., Dupraz, S., Battaglia-Brunet, F., Sergeant, C., Garrido, F. et Joulian, C. (2011). Influences des paramètres pression, température et salinité sur l'activité métabolique de souches anaérobies colonisant les environnements de subsurface. Colloque AFEM 2011, Hammamet, Tunisie (**communication orale**).

Barsotti, V., Joulian, C., Sergeant, C., Ollivier, B., Ménez, B., Le Marrec, C., Fardeau, M.L., Gérard, E., Guyot, F. et Garrido, F. (2011). Biodiversité dans différents compartiments du Trias traversés par le forage ANDRA à 2000 mètres dans le Mésozoïque du Bassin de Paris. Congrès ASF, Dijon, France (**communication orale**).

Barsotti, V., Sergeant, C., Kheleifa, S., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Ménez, B., Gérard, E., Guyot, F., Harris-Hellal, J., Garrido, F. et Joulian, C. (2011). Caractérisation microbiologiques des formations du Trias traversées par un forage de 2000 mètres dans le Mésozoïque du Bassin de Paris: avancement des travaux. Réunion TAPSS 2000, Orsay, France (**communication orale**).

Barsotti, V., Harris-Hellal, J., Sergeant, C., Le Marrec, C., Garrido, F. et Joulian, C. (2010). Etude comparative de méthodes d'extraction d'ADN à partir de roches profondes du trias pauvres en biomasse. RST 2010, Bordeaux, France (**communication orale**).

Barsotti, V., Joulian, C., Le Marrec, C., Garrido, F. et Sergeant, C. (2010) Recherche et caractérisation de micro-organismes au sein de compartiments géologiques profonds (Meuse/Haute Marne). Réunion TAPSS 2000, Orsay, France (**communication orale**).

Barsotti, V., Joulian, C., Sergeant, C., Le Marrec, C. et Garrido, F. (2010) Comparative study of DNA extraction methods from extreme, low biomass environments. ISME 2010, Seattle, USA (**poster**).

Barsotti, V., Sergeant, C., Joulian, C., Le Marrec, C., Coulon, S., Vesvres, M.-H. and Garrido, F. (2010) Microbial investigations of deep geological compartments. 4th International ANDRA Meeting, Nantes, France (**poster**).

Barsotti, V., Joulian, C., Coulon, S., Le Marrec, C., Garrido, F et Sergeant, C. (2009). Optimisation de méthodes d'extraction d'ADN à partir de roches gréseuses profondes : approche de la biodiversité de subsurface. Colloque AFEM 2009, Lyon, France (**poster**, lauréate du troisième prix des posters).

Articles publiés

Stroes-Gascoyne, S., Sergeant, C., Schippers, A., Hamon, C.J., Nèble, S., Vesvres, M.-H., **Barsotti, V.**, Poulain, S. and Le Marrec, C. (2011). Biogeochemical processes in a clay formation *in situ* experiment: Part D – Microbial analyses – Synthesis of results. *Applied Geochemistry*, 26 (6): 980-989.

Fardeau, M.-L., **Barsotti, V.**, Cayol, J.-L., Guasco, S., Michotey, V., Joseph, M., Bonin, P. and Ollivier, B. (2010). *Caldinitratiruptor microaerophilus*, gen. nov., sp. nov. isolated from a French hot spring (Chaudes-Aigues, Massif Central): a novel cultivated facultative microaerophilic anaerobic thermophile pertaining to the *Symbiobacterium* branch within the *Firmicutes*. *Extremophiles*, 14 (3): 241-247.

Avant-propos

Cette thèse, fruit d'une collaboration entre le CNRS et le BRGM (Bureau de Recherche Géologique et Minière), a été effectuée au sein des laboratoires de l'équipe Environnement et Chimie Nucléaire du CNAB (Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique et Bio-Environnementale) jusqu'en décembre 2010 (devenue une partie de l'équipe Radioactivité et Environnement du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan au 1^{er} janvier 2011) et de l'unité EPI, service BioGéochimie Environnementale (BGE), du BRGM. La bourse de thèse (octobre 2007-septembre 2010) est une BDIE co-financée par le CNRS et le BRGM, alors qu'une convention liant le CNAB à l'unité EPI du BRGM a permis de financer sur les fonds propres des équipes six mois supplémentaires en 2011/2012 pour la seconde partie de ce travail (résultats dans le chapitre V). L'ensemble des travaux a été financièrement supporté par le BRGM et le CNAB lui-même soutenu par le Groupement National de Recherche FORPRO (FORMations géologiques PROfondes), financé par le CNRS et l'ANDRA (Agence Nationale pour la gestion des Déchets RADioactifs). FORPRO avait pour mission de piloter des recherches sur la faisabilité du stockage géologique profond de déchets radioactifs de moyenne et haute activité à vie longue (MHA-VL) constituant l'axe II de recherche fixé par la loi Bataille n°91-1381 du 30 décembre 1991.

Les études de faisabilité d'un tel stockage géologique constituent des projets nationaux et internationaux pluridisciplinaires favorisant la mise en place d'une dynamique d'échange entre les différentes communautés scientifiques. En France, la formation géologique ciblée pour l'enfouissement de déchets radioactifs MHA-VL est l'argilite du Callovo-Oxfordien (COx). Cette couche sédimentaire argileuse est étudiée au niveau du site de Meuse/Haute-Marne, à Bure, dans un laboratoire souterrain de recherche implanté à 490 mètres de profondeur. En 2007, l'ANDRA a proposé à la communauté scientifique d'utiliser des échantillons issus de la campagne de forage de la zone de transposition du laboratoire souterrain de Meuse/Haute Marne afin d'étudier la possibilité d'implanter un potentiel site de stockage. Cette étude s'inscrit dans le programme pluridisciplinaire et multi-organismes TAPSS 2000 (Transferts Actuels et Passés dans un Système Sédimentaire aquifère-aquitard : un forage de 2000 mètres dans le Mésozoïque du Bassin de Paris) et constitue l'une des tâches du projet, intitulé « Microbiologie et Biogéochimie de sous-sol », ayant pour objectif l'étude microbiologique des compartiments géologiques triasiques traversés par le forage profond EST433.

Table des matières

INTRODUCTION	21
CHAPITRE I :	27
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
1. LES HABITATS MICROBIENS DE SUBSURFACE.....	29
1.1. La biosphère océanique profonde	29
1.1.1. Les environnements de la croûte océanique	31
1.1.2. Les sédiments océaniques profonds	32
1.2. Les environnements pétroliers	36
1.2.1. Les métabolismes microbiens majoritairement retrouvés	37
1.2.2. Contraintes physiques et événements géologiques	39
1.3. La biosphère continentale profonde.....	41
1.3.1. Les aquifères	43
1.3.1.1. Les aquifères des roches ignées et métamorphiques	44
1.3.1.2. Les aquifères sédimentaires	49
1.3.2. Les aquitards/aquicludes	53
1.3.2.1. Les aquitards cristallins	54
1.3.2.2. Les aquitards sédimentaires	55
1.3.3. Les évaporites de subsurface	57
1.4. Les limites de vie en subsurface	59
2. L'ECHANTILLONNAGE DES ENVIRONNEMENTS DE SUBSURFACE : METHODOLOGIES ET CONTRAINTES	64
3. LA CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE DES ENVIRONNEMENTS DE SUBSURFACE.....	68
3.1. Approches microbiologiques classiques	68
3.2. Approches cultures-indépendantes	71
3.2.1. Composition en acide gras phospholipidiques (PLFA)	71
3.2.2. Ecologie moléculaire	72
3.2.2.1. Considérations générales	72
3.2.2.3. Extraction d'ADN	77
3.2.2.4. Les outils moléculaires	79
3.2.2.4.1. Les outils moléculaires « directs »	79
3.2.2.4.2. Les outils moléculaires « PCR-dépendants »	80
Les banques de clones	82
Les techniques d'empreintes moléculaires	82
4. RETOMBEES ET APPLICATIONS DE LA CONNAISSANCE DE LA BIOSPHERE PROFONDE	88
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	93
A. DES ROCHES SEDIMENTAIRES PROFONDES COMME MATRICES D'ETUDE.....	95
A.1. Sites d'étude et échantillons	95
A.1.1. Contexte géo-morphologique du Bassin Parisien et site d'étude	95
A.1.2. Modalités techniques du forage EST 433	97
A.1.3. Les échantillons étudiés	99
A.1.3.1. Pré-conditionnement des échantillons sur site	101
A.1.3.2. Sous-échantillonnage en laboratoire	104
A.2. Approches culturelles	106
A.2.1. Enrichissements à partir des matrices gréseuses profondes	107
A.2.2. Communauté microbienne des fluides de forage et bioaérosols	110

A.3.	Ecologie moléculaire.....	111
A.3.1.	Extraction d'ADN.....	111
A.3.1.1.	Protocoles d'extraction d'ADN testés sur les roches sédimentaires du Trias	111
A.3.1.2.	Pré-traitement des boues de forage et extraction d'ADN.....	117
A.3.1.3.	Extraction d'ADN à partir de cellules bactériennes.....	118
A.3.2.	Purification des extraits d'ADN environnementaux	118
A.3.3.	Amplification par PCR du gène codant l'ARN ribosomique 16S.....	119
A.3.4.	Analyse de la biodiversité moléculaire	122
A.3.4.1.	Structure des communautés microbiennes par CE-SSCP.....	122
A.3.4.2.	Composition de la communauté bactérienne majoritaire par DGGE.....	123
A.3.5.	Banque de clones et séquençage	125
A.3.6.	Analyses phylogénétiques	126
B.	... AUX COLONISATEURS MICROBIENS ENDOGENES DES ENVIRONNEMENTS DE SUBSURFACE	
	127	
B.1.	Souches microbiennes et paramètres de culture	127
B.2.	Mesures et traitements des données.....	130
B.2.1.	Mesures du pH	130
B.2.2.	Mesures de la densité optique (DO).....	132
B.2.3.	Mesures de l'activité métabolique	132
B.2.4.	Traitement des données de CPG.....	134
B.3.	Plan d'expérience	137
B.3.1.	Définition et généralités.....	137
B.3.2.	Construction du plan factoriel complet	138
B.3.5.	Modélisation des données	139
B.3.4.	Définition des facteurs du plan factoriel 2 ³ complet.....	140
	CHAPITRE III : CARACTERISATION DES FORMATIONS TRIASIQUES TRAVERSEES PAR LE FORAGE PROFOND EST433, ANDRA	141
1.	DESCRIPTIONS LITHOSTRATIGRAPHIQUES DES FORMATIONS DU TRIAS MOYEN	143
2.	HISTOIRE SEDIMENTAIRE DES COMPARTIMENTS TRIASIQUES.....	146
3.	TEMPERATURES ET PALEO-TEMPERATURES DES FORMATIONS DU TRIAS AU COURS DE L'EVOLUTION DU BASSIN.....	146
4.	MATERIELS ETUDIES - PROVENANCE DES ECHANTILLONS	147
5.	LES EAUX DANS LES FORMATIONS DU TRIAS.....	149
6.	LIXIVIATION DES ROCHES ET EAUX NATURELLES PRELEVEES.....	152
7.	CONSTRAINTES NATURELLES DU MILIEU APPORTEES AUX CONDITIONS EXPERIMENTALES....	157
	CHAPITRE IV PREMIERE PARTIE : INVESTIGATIONS MICROBIOLOGIQUES PRELIMINAIRES DES FORMATIONS TRIASIQUES PROFONDES A L'APLOMB DU FORAGE EST433 (MEUSE/HAUTE MARNE, FRANCE).....	159
1.	EVALUATION DE LA CONTAMINATION DANS LES CAROTTES DE ROCHE DU TRIAS.....	161
2.	BACTERIES VIABLES DANS LE CŒUR DES CAROTTES DE ROCHES	167
3.	COMPARAISON DE METHODES D'EXTRACTION D'ADN ENVIRONNEMENTAL A PARTIR DE FORMATIONS SEDIMENTAIRES PROFONDES.....	168
3.1.	Primo-évaluation des méthodes d'extraction à partir d'une formation gréseuse profonde	169
3.2.	Comparaison de la biodiversité détectée dans les quatre compartiments du Trias	177
3.3.	Composition des communautés bactériennes des formations géologiques profondes du Trias.....	186

4. CONCLUSION.....	193
CHAPITRE IV DEUXIEME PARTIE : CARACTERISATION DE LA DIVERSITE MICROBIENNE D'ECHANTILLONS INCUBES PROVENANT DES FORMATIONS TRIASIQUES PROFONDES A L'APLOMB DU FORAGE EST433 (MEUSE/HAUTE MARNE, FRANCE).....	
1. EXTRACTION ET AMPLIFICATION DES ADN	199
2. COMPARAISON DES PROFILS DE DIVERSITE.....	202
3. DIVERSITE BACTERIENNE.....	206
4. CONCLUSION.....	214
CHAPITRE V : EFFETS DES PARAMETRES PRESSION, TEMPERATURE ET SALINITE SUR L'ACTIVITE METABOLIQUE DE SOUCHES ANAEROBIES ORIGINAIRES D'ENVIRONNEMENTS DE SURFACE ET DE SUBSURFACE	
1. ACTIVITES METABOLIQUES.....	220
2. CROISSANCE CELLULAIRE ET ACTIVITE METABOLIQUE	228
3. INFLUENCES DES PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES ET DE LEURS INTERACTIONS SUR L'ACTIVITE METABOLIQUE.....	232
4. DISCUSSION :	237
5. CONCLUSION.....	241
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	255
ANNEXES	279

Abréviations et sigles

A: Adénine	COx: Callovo-Oxfordien
ACP: Analyse en Composante Principale	CPG : Chromatographie Phase Gazeuse
ADN: Acide désoxyribonucléique	CRB: Columbia River Basalt
ANDRA: Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs	CTAB: Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
APC: Advanced Piston Coring	DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole
APS: Ammonium persulfate	DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
AQDS: Anthraquinone-2,6-disulfonate	DMSO: Dimethyl sulfoxide
ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate
ARISA: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis	DO: Densité optique
ARN: Acide ribonucléique	DRX: Diffraction aux Rayons X
ARNr: ARN ribosomique	DSDP: Deep Sea Drilling Program
BAG: Boîte à Gants	DSMZ: Collection Allemande de Microorganismes et Cultures Cellulaires
BET: Bromure d'éthidium	EDTA: Ethylène diamine tétra-acétate (sel disodique)
BFR: Bactéries ferri-réductrices	FISH: Fluorescent <i>In-Situ</i> Hybridization
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	G: Guanine
bsf : Below sea floor	H₂: Dihydrogène (également nommé hydrogène par abus de langage)
BSR: Bactéries sulfato-réductrices	H₂S: Sulfure d'hydrogène
C: Cytosine	HAP: Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
CCSD: Chinese Continental Scientific Drilling	HRL: Hard Rock Laboratory
CE-SSCP: Capillary Electrophoresis - SSCP	i.e.: <i>id est</i> (c'est à dire)
CFU: Colony Forming Unit	I: Force ionique
CH₄: Méthane	IGS: Intergenic Sequence
CM-DGGE: Co-Migration-DGGE	IODP: International Ocean Drilling Program
CMFF: Combinable Magnetic Resonance Free Fluid volume	MDA: Multiple Displacement Amplification
CO₂: Dioxyde de carbone	MEOR: Microbially Enhanced Oil Recovery
COD: Carbone organique dissous	
COT: Carbone organique total	

MHA-VL: Moyenne et Haute Activité à Vie Longue
N: Azote
N₂: Azote gazeux
NaCl: Chlorure de sodium (sel principalement utilisé par la communauté microbiologiste)
O₂: Dioxygène
OAM: Oxydation anaérobie du méthane
ODP: Ocean Drilling Program
OTU: Operational Taxonomic Unit
P: Phosphore
pb: Paire de bases
PCI: Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique
PCR: Polymerase chain reaction
PLFA: Phospholipids fatty acid
PTFE: polytétrafuoroéthylène (téflon)
PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone
qsp: Quantité suffisante pour
RDP: Ribosomal Data Project
RISA: Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
RSGP: Reverse Sample Genome Probing
SDS: Sodium dodecylsulfate
SLiME: Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystem

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
T: Thymine
TAE: Tris-Acetate EDTA
TAPSS 2000: Transferts Actuels et Passés dans un Système Sédimentaire aquifère – aquitard : un forage de 2000 mètres dans le Mésozoïque du Bassin de Paris
TCMR: Total Combinable Magnetic Resonance porosity
TE: Tampon Tris-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-Tetraméthyl-éthylènediamine
TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
t-RFLP: Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
U.V: Ultraviolet
U: Unité
UFC: Unité Formant Colonie
UHT: Ultra Haute Température
XCB: Extended Core Barrel
ZT: Zone de Transposition

Unités et dimension

°C: degré Celsius

cpm: coups par minute

daN: décaNewton ou 10 Newton

g: gramme

J: Joule

L: litre

m: mètre

M: mole.L⁻¹

ppm: partie par million en rapport masse sur volume, équivalent à des mg.L⁻¹

rpm: rotation par minute

V: volt

x g : force centrifuge relative (équivalent à rcf)

Dénomination	kilo	centi	milli	micro	nano	fento
	k	c	m	μ	n	f
Puissance de 10	10 ³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁵
Exemple : μm = micromètre= 10 ⁻⁶ m			nM = nanomolaire = 10 ⁻⁹ M			

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1. Représentation schématique des circulations de fluides dans la croûte océanique et positionnement des zones favorables à la vie microbienne (d'après Edwards et al., 2005).	30
Figure 2. Distribution de la densité cellulaire en fonction de la profondeur au niveau des sites 1035 et 1036 (Cragg et al., 2000).	33
Figure 3. Représentation schématique de la distribution des sources d'énergie biodisponibles dans les sédiments marins profonds (d'après Delong, 2004 et Amend et Teske, 2005).	35
Figure 4. Représentation schématique de l'accumulation d'hydrocarbures dans un piège géologique de type anticline (Planckaert, 2005).	37
Figure 5. Comparaison de deux systèmes pétroliers, l'un soumis à une subsidence continue et l'autre à une remontée du bassin (Wilhelm et al., 2001).	41
Figure 6. Organisation structurale des biotopes de subsurface et des flux de carbone dans la croûte terrestre (Obolin et al., 2008).	42
Figure 7. Représentation schématique du cycle de la matière organique au sein des aquifères granitiques profonds (d'après Pedersen, 1997).	45
Figure 8. Représentation schématique des processus géomicrobiologiques dans la zone d'interface aquifère/aquitard (d'après Frederickson et Balkwill, 2006).	51
Figure 9. Relation entre la profondeur, l'activité de sulfato-réduction et les teneurs en carbonnes organiques totaux (COT) sur le site du Cerro Negro (Krumholz et al., 1997).	52
Figure 10. Biomasse cultivable et activité bactérienne dans les argiles de Mol en fonction de la profondeur de prélèvement par rapport à la paroi de la galerie du laboratoire souterrain (Boivin-Jahns et al., 1996).	56
Figure 11. Détection de microorganismes cultivables dans les eaux de gisements pétroliers en fonction de deux paramètres <i>in-situ</i> : la température et la salinité (source : Magot et Ollivier extrait d'Alazard et al., 2010).	62
Figure 12. Comparaison de 34 résultats de tests de contamination par traceurs particuliers (microsphères) et chimiques (composés perfluorocarbonés ou PFT (d'après House et al., 2003).	65
Figure 13. Dénombrement microbien réalisé sur des échantillons d'eau collectés aux différentes étapes d'une procédure de nettoyage (Basso et al., 2005).	67
Figure 14. Images radio-isotopiques de l'activité de sulfato-réduction se déroulant à la surface de carottes de roche fraîchement prélevées (Krumholz et al., 1997).	68
Figure 15. Représentation schématique de l'arbre de la vie basée sur l'analyse des séquences de la petite sous unité des ARNr (López-García et Moreira, 2008).	73
Figure 16. Représentation schématique de la distribution des régions conservées (A à J) et hypervariables (V1 à V9) du gène de l'ARNr 16S d' <i>Escherichia coli</i> .	75
Figure 17. Contexte géologique générale du Bassin Parisien.	95
Figure 18. Coupe schématique de l'organisation des dépôts sédimentaires du Bassin Parisien (d'après (Cavelier et al., 1979).	96
Figure 19. Localisation des plates-formes de forages de la campagne ZT 2007-2008.	97
Figure 20. Echantillons de roches sédimentaires carottées dans les compartiments du Trias moyen.	99
Figure 21. Procédure de pré-conditionnement des carottes issues du forage EST433.	102
Figure 22. Enceinte haute pression	104
Figure 23. Procédure de sous-échantillonnage des carottes de roche en laboratoire (dans une boîte à gants sous atmosphère N ₂).	105
Figure 24. Corrélation entre la force ionique et le pH théorique mesuré pour le tampon technique TPL 7 (pH = 7,00 pour I = 0,31).	131

Figure 25. Localisation des carottes sur une coupe synthétique des terrains du Trias, Lias et Jurassique à l'aplomb du forage EST433.....	144
Figure 26. Echantillons EST31465 de la passe K2-20 carotté dans le Trias moyen.	148
Figure 27. Echantillons de Grès à <i>Voltzia</i> : EST31602 (A) et EST31604 (B).	148
Figure 28. Echantillon EST31572 fractionné à partir de la passe K2-18 originaire du Trias moyen.....	149
Figure 29. Echantillon EST31386 foré dans le Trias moyen.	149
Figure 30. Profil des teneurs en eau des roches sédimentaires du Trias. Les données sont extraites du rapport de mesure du forage EST433 (document ANDRA, D.RP.0GRS.08.0006).	150
Figure 31. Log composite et profils RMN (TCMR et CMFF) des formations triasiques rencontrées dans le forage EST433 (document ANDRA, D.RP.0GRS.08.0006A).	151
Figure 32. Distribution du réseau poral dans les roches sédimentaires du Trias et porosimétrie mercure (analyses réalisées au BRGM dans le cadre de cette thèse).	152
Figure 33. Amplification du gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN environnementaux bruts extraits par les protocoles 2 (P2) et 3 (P3) à partir du cœur et de la périphérie de la carotte K2-20.....	171
Figure 34. Amplification d'environ 200 pb du gène codant l'ARNr 16S à partir d'ADN environnementaux bruts extraits à partir de K2-20p à l'aide des protocoles d'extraction 3 (A) et 2 (B) en utilisant le couple d'amorce w34FAM/w49.....	174
Figure 35. Structures des communautés bactériennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20p par le protocole 2 (basique avec une étape de lavage, en vert), le protocole 2W (sans lavage de l'échantillon, en bleu) et le protocole 2D (avec une étape de désorption, en noir).	175
Figure 36. Structures des communautés bactériennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20p par les quatre versions du protocole 3.....	176
Figure 37. Efficacité de l'amplification PCR du fragment de gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN environnementaux concentrés bruts (A) et dialysés (B) extraits des quatre échantillons naturels étudiés avec le protocole d'extraction 4.	178
Figure 38. Structures des communautés archaéennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20i par les protocoles d'extraction 2 (profil vert) et 3 (profil bleu).	179
Figure 39. Diversité de la communauté bactérienne majoritaire détectée par DGGE à partir des ADN environnementaux dialysés extraits des quatre compartiments géologiques profonds avec les protocoles 2, 3 et 4.	181
Figure 40. A. Cercle de corrélation de l'ACP établissant une matrice de corrélation entre les différentes caractéristiques physicochimiques des formations sédimentaires profondes. B. Analyse en composantes principales des quatre roches sédimentaires profondes étudiées.	184
Figure 41. Analyse en composantes principales de la diversité bactérienne détectée par DGGE pour les quatre échantillons de roches sédimentaires profondes en fonction de chaque protocole d'extraction.	185
Figure 42. Arbre phylogénétique représentant la position au sein des <i>Proteobacteria</i> des séquences d'ARNr 16S issues des bandes DGGE.	187
Figure 43. Arbre phylogénétique représentant la position des séquences d'ARNr 16S issues des bandes DGGE au sein des <i>Bacteria</i> hors <i>Proteobacteria</i>	189
Figure 44. Amplifications du gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN extraits des quatre carottes incubées à pression atmosphérique (A) et sous pression (B).	201
Figure 45. Dendrogrammes de similarité et profils DGGE des fragments de gène codant l'ARNr 16S amplifiés à partir des matrices environnementales incubées.	206
Figure 46. Structure des communautés bactériennes majoritaires détectées par DGGE à partir de différentes matrices environnementales K2-20.....	208
Figure 47. Proportion et répartition des groupes taxonomiques appartenant au domaine <i>Bacteria</i> retrouvés dans les différents échantillons K2-20.	214

Figure 48. Activité métabolique normalisée de l'archée méthanogène <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité (A) et à pression constante de 90 bars (B).....	221
Figure 49. Activité métabolique normalisée de l'archée méthanogène méthylotrophe <i>Methanohalobium evestigatum</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité.....	222
Figure 50. Activité métabolique normalisée de la bactérie sulfato-réductrice <i>Desulfotomaculum geothermicum</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité.....	223
Figure 51. Activité métabolique normalisée de la bactérie sulfato-réductrice <i>Desulfovibrio profundus</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité.....	224
Figure 52. Activité métabolique normalisée de la bactérie thiosulfato-réductrice <i>Petrotoga mexicana</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité (A) et à 55°C (B).	225
Figure 53. Activité métabolique normalisée de la bactérie thiosulfato-réductrice <i>Thermosipho japonicus</i> sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L ⁻¹ de NaCl et incubé à 55°C à 1 bar.....	226
Figure 54. Activités métaboliques normalisées des bactéries fermentaires <i>Thermovirga lienii</i> (A) et <i>Halothermothrix orenii</i> (B) sous différentes conditions de température, pression et salinité.....	227
Figure 55. Activités métaboliques et croissances cellulaires mesurées après 30 jours d'incubation dans les six conditions expérimentales.....	231
Figure 56. Concentrations en H ₂ S (gris foncé) et acétate (gris clair) produits par les souches <i>T. japonicus</i> (A) et <i>P. mexicana</i> (B) dans six conditions d'incubation différentes.....	232
Figure 57. Distribution des formations sédimentaires triasiques profondes en fonction de leurs paramètres de température et de salinité <i>in-situ</i> actuels et de leurs paléo-températures dans la représentation hypothétique de limite de vie des eaux de gisements pétroliers (selon Bernard et al., 1992 modifié par Magot et Ollivier, extrait d'Alazard et al., 2010).	249

Liste des tableaux

Tableau 1. Teneurs en dihydrogène et en biomasses totales dans différents environnements (D'après Kotelnikova, 2002).	46
Tableau 2. Cultivabilité déterminée comme le rapport des bactéries cultivables sur le nombre total de cellules déterminé par comptage direct des unités formant colonies (Amann et al., 1995)	69
Tableau 3. Récapitulatif des échantillons naturels originaires du forage EST433.	100
Tableau 4. Echantillons destinés à une conservation sous pression.....	103
Tableau 5. Durée de la période de stockage des carottes de roches avant leur sous échantillonnage en laboratoire et temps nécessaire à la réalisation du conditionnement sous forme de poudre.....	106
Tableau 6. Métabolismes microbiens ciblés dans l'étude de la biosphère cultivable contenue dans les roches gréseuses du Trias.....	108
Tableau 7. Récapitulatif des teneurs en NaCl testées, du mode de conservation des inocula et paramètres d'incubation en fonction des milieux d'enrichissement utilisés.....	109
Tableau 8. Conditions d'exposition des boîtes de Pétri lors de l'étape de pré-conditionnement sur site.....	111
Tableau 9. Protocoles d'extraction d'ADN utilisés sur les différents échantillons du Trias.....	113
Tableau 10. Programme PCR type.....	119
Tableau 11. Séquences et sources des amorces.....	120
Tableau 12. Domaines d'application des couples d'amorces utilisés dans cette étude	121
Tableau 13. Compositions du gradient de dénaturation et du top gel constituant un gel DGGE.....	124

Tableau 14. Description des souches microbiennes utilisées	128
Tableau 15. Conditions d'incubation dans les milieux d'étude	130
Tableau 16. Plan factoriel 2 ³ complet pour l'étude de 3 facteurs A, B et C	138
Tableau 17. Traitement matriciel du plan factoriel 2 ³ complet.	139
Tableau 18. Définition des niveaux de trois facteurs pour les plans factoriels 2 ³ complets.....	140
Tableau 19. Analyses géochimiques des lixiviats à l'eau milliQ (liquide/solide = 10) des échantillons naturels de roches du Trias réalisées au BRGM. L'échantillon référence 31467 a été fractionné à partir de la passe K2-20, l'échantillon 31602 à partir de K2-19, l'échantillon 31571 à partir de K2-18 et l'échantillon 31387 à partir de K2-17.	153
Tableau 20. Caractéristiques principales des échantillons du Trias étudiés.....	155
Tableau 21. Distribution des phylotypes contaminants identifiés dans les différents contrôles négatifs.	165
Tableau 22. Récapitulatif des amplifications du gène codant l'ARNr 16S bactérien (amorces Fd1deg/1492R) à partir des extraits d'ADN obtenus par les quatre protocoles testés.	171
Tableau 23. Amplifications des extraits d'ADN obtenus lors des essais d'optimisation des protocoles d'extraction 1, 2 et 3 à partir de K2-20p. Les résultats ont été obtenus en utilisant le couple d'amorces w34FAM/w49.	173
Tableau 24. Amplifications des extraits d'ADN obtenus par différents protocoles en ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S bactérien en utilisant le couple d'amorces Fd1deg/1492R.	178
Tableau 25. Identification des bandes DGGE excisées	210
Tableau 26. Effets des paramètres température (T), pression (P), salinité (S) et de leur interaction sur l'activité métabolique (A) dans les conditions du plan factoriel pour les huit souches microbiennes étudiées.	240

Introduction

De nos jours, de nombreuses activités anthropiques sont en relation avec l'exploitation des environnements de subsurface. Ces écosystèmes profonds, résultat de nombreux processus géologiques fondamentaux, sont influencés par les communautés procaryotiques résidentes. Le domaine regroupant l'étude des rôles passés et présents joués par les micro-organismes au sein de la lithosphère se nomme géomicrobiologie. Cette discipline a été définie comme l'étude des processus microbiens se déroulant dans les sédiments modernes, dans les eaux souterraines circulant à travers les roches sédimentaires et ignées ainsi que dans la croûte terrestre tempérée où la physiologie de micro-organismes spécifiques joue un rôle dans les procédés géochimiques actuels (Kuznetsov et al., 1963).

La géomicrobiologie n'est donc pas une science récente ; cependant elle se révèle être actuellement un domaine en plein essor. Au cours des 50 dernières années, de nombreuses découvertes fondamentales liées à la géomicrobiologie ont permis de déplacer les limites du vivant. Grâce aux concepts de limites environnementales (pH et Eh) et de thermophilie introduits par l'équipe de Baas Becking et al. (1960) et Brock (1978) les études microbiologiques ont été élargies aux environnements anciennement qualifiés comme impropres au développement de la vie. De plus, les travaux conduits sur différents écosystèmes profonds tels que les fosses hydrothermales abyssales, les réservoirs pétroliers et les aquifères (Jannasch et Mottl, 1985; Magot et al., 2000; Pedersen, 1993), ont démontré, à la communauté scientifique, l'existence de populations procaryotiques actives colonisant le sous-sol de la Terre.

Malgré les avancées scientifiques de ces dernières années, la composition et l'organisation des écosystèmes profonds restent encore mal connues. Il apparaît pertinent, voire stratégique, d'explorer de nouveaux environnements et notamment le sous-sol terrestre, afin de rechercher l'éventuelle présence de vie microbienne et d'identifier la diversité de sa fonctionnalité. La prospection active des bio-richesses et bio-ressources du sous-sol permet d'améliorer nos connaissances sur les origines, les distributions et les fonctions des populations microbiennes autochtones dans le but d'aboutir à une meilleure compréhension des cycles biogéochimiques se déroulant *in-situ*. À terme, des applications industrielles et biotechnologiques potentielles en découleront. L'isolement de nouvelles espèces microbiennes endogènes des profondeurs offrira des opportunités dans la découverte de nouvelles molécules dont les propriétés actives pourront être utilisées, par exemple, dans l'industrie pharmaceutique, dans la bioremédiation d'environnements contaminés ou encore dans l'amélioration de la production énergétique. L'acquisition de connaissances sur la biosphère profonde permettrait aussi la réduction des risques et des coûts industriels lors de l'exploitation de mines et de forages ainsi qu'une

meilleure gestion des sites de stockage de déchets radioactifs et de séquestration du CO₂ en couches géologiques profondes ou encore des nappes phréatiques et autres aquifères.

En dépit de l'importance scientifique et potentiellement économique, notre connaissance de la biosphère profonde reste limitée. Selon certains auteurs, une part importante de la communauté procaryotique totale serait contenue dans le sous-sol (Aitken et al., 2004; D'Hondt et al., 2004; Parkes et al., 2000; Whitman et al., 1998). Toutefois, les forages dédiés aux études microbiologiques restent marginaux (CCSD project¹, ODP leg 201²). Plus communément, des collections d'échantillons originaires de biotopes profonds ont été récoltés *via* des « fenêtres ouvertes » sur les environnements de subsurface : les mines (Baker et al., 2003a; Onstott et al., 2003; Russell, 1997), les forages pétroliers (Magot et al., 2000) ou les puits d'échantillonnage des aquifères profonds (Basso et al., 2005). Les principaux obstacles rencontrés lors des études menées sur les écosystèmes profonds résultent (i) de notre capacité d'accès limitée, (ii) de la difficulté d'acquérir des échantillons non contaminés et (iii) de notre compréhension insuffisante de ces milieux afin de mettre en relation nos connaissances des micro-organismes avec le contexte environnemental.

Dans le cadre de la problématique du stockage de déchets radioactifs de moyenne et haute activité à vie longue (MHA-VL) en couches géologiques profondes, l'état français, par l'intermédiaire de l'ANDRA (Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs), a exploré et étudié activement le sous-sol afin de déceler de potentiels sites de confinement. La couche sédimentaire argileuse du site de Meuse/Haute-Marne (Bure), située entre 400 et 600 mètres de profondeur, présente des aptitudes naturelles à la rétention de solutés et de résistance aux déformations causées par les événements géologiques naturels et l'excavation humaine de galeries. La construction d'un laboratoire souterrain de recherche, implanté à 490 mètres de profondeur a permis d'étudier les caractéristiques *in-situ* de l'argilite du Callovo-Oxfordien (Cox) en vue de l'implantation possible d'un site de stockage de déchets MHA-VL. Aucun stockage n'étant prévu au sein même du laboratoire souterrain, l'ANDRA a défini les contours d'une zone plus vaste, dite de transposition (ZT) où les propriétés de l'argilite du Cox seraient équivalentes à celles décrites dans le laboratoire souterrain. L'étude de cette ZT a nécessité la réalisation de plusieurs forages dont un recoupant les formations géologiques du Jurassique (-500 m) jusqu'au Trias (-2000 m). Cette campagne de forage avait deux objectifs principaux : (i) fournir des éléments scientifiques permettant de préciser la ou les variation(s) éventuelle(s) des caractéristiques du Callovo-Oxfordien en éclairant de manière homogène l'ensemble de la ZT en vue de l'implantation d'un

¹ CCSD project :Zhang et al., 2005 ; lien internet du projet : <http://www.ccsd.org>.

² ODP leg 201 :D'hondt et al., 2003 et 2004 ; lien internet du programme ODP : <http://www-odp.tamu.edu>

site de stockage de déchets radioactifs de haute activité et à longue vie (HA-VL) en couche géologique profonde et (ii) compléter la connaissance phénoménologique à l'échelle de la ZT et du secteur, concernant essentiellement les écoulements et les transferts dans les encaissants profonds ainsi que l'évaluation des ressources géothermiques du Trias.

C'est dans ce contexte scientifique qu'un projet de géomicrobiologie intitulé «Microbiologie et Biogéochimie du sous-sol», rattaché au programme TAPSS2000³ et dans lequel s'est intégré cette thèse, a été proposé lors de l'appel d'offre du GNR FROPRO (dépendant du CNRS et de l'ANDRA) en 2008. En effet, cette campagne « multi-forages » de grande envergure a fourni une occasion rare d'étudier les environnements terrestres profonds, d'un point de vue microbiologique, en offrant un accès direct à différents faciès géologiques extraits le long d'une gamme de profondeur étendue, comprise entre 500 et 2000 mètres de profondeur. L'une des particularités de cette campagne de forage réside dans le carottage d'échantillons à partir d'écosystèmes considérés comme « non perturbés » avant forage *i.e.* extraits depuis la surface dans une zone n'ayant subi aucune excavation préalable (à l'inverse des mines et autres tunnels creusés). Enfin, la dernière originalité demeure dans la réalisation d'un forage terrestre profond permettant l'échantillonnage de compartiments géologiques situés à plus de 1700 m de profondeur. Au-delà de la prouesse technique, seuls quelques travaux ont porté sur l'étude microbiologique de biotopes aussi profonds au niveau international (Chapelle et al., 2002; Colwell et al., 1997; Onstott et al., 2003; Zhang et al., 2005).

Le premier volet de ce travail de thèse s'est essentiellement focalisé sur les échantillons de roches les plus profonds, forés dans les compartiments géologiques du Trias. La caractérisation des communautés procaryotiques séquestrées au sein des différentes roches a constitué le principal objectif de cette partie. Le second volet de cette étude s'est, quant à lui, intéressé aux modifications des domaines d'activités et des réponses métaboliques de différentes souches anaérobies sous l'influence de trois paramètres physico-chimiques importants en subsurface, à savoir la température, la pression et la salinité.

Ce mémoire est structuré en cinq chapitres :

³ TAPSS2000 : Transferts actuels et passés dans un système sédimentaire aquifère – aquitard : un forage de 2000 mètres dans le Mésozoïque du Bassin de Paris

- le premier fait état des connaissances acquises sur les communautés microbiennes colonisant les environnements profonds. Ce chapitre traite également des méthodes d'échantillonnages et des techniques de traçages spécifiques aux écosystèmes de subsurface ainsi que des approches les plus fréquemment utilisées pour la caractérisation microbiologique des biotopes profonds, et notamment celles réalisées à partir de matrices environnementales consolidées. Enfin, un paragraphe plus général abordant les retombées et les potentielles applications de la connaissance de la biosphère profonde termine ce chapitre.
- le second présente l'ensemble des méthodes analytiques utilisées dans le cadre de ce travail. Ce chapitre se divise en deux parties. La première fait référence aux différentes méthodes utilisées pour décrire et caractériser les écosystèmes sédimentaires d'un point de vue microbiologique. La seconde décrit les techniques, justifie le traitement mathématique et présente les plans d'expériences appliqués pour analyser la variabilité des domaines d'activité de différentes souches en fonction de paramètres physicochimiques.
- le troisième traite d'une approche non biologique basée sur une caractérisation minéralogique et physico-chimique des échantillons de roches extraits de quatre compartiments géologiques profonds. Ce chapitre a été réalisé afin de mieux appréhender l'évolution de ces écosystèmes atypiques.
- le quatrième est constitué de deux parties. Dans un premier temps, une étude microbiologique, basée sur une double approche culturale et moléculaire, a été menée à partir des quatre échantillons de roche sédimentaires décrits précédemment. Dans un second temps, l'échantillon naturel considéré comme le plus propice à une colonisation microbienne a subi une analyse moléculaire approfondie en utilisant différents lots de roches incubées au cours de l'approche culturale.
- Le cinquième s'est intéressé à la notion de domaine d'activité métabolique en subsurface et notamment, aux effets combinés de trois paramètres physico-chimiques (température, pression et salinité) sur l'activité métabolique de huit souches anaérobies thermo-tolérantes et halophiles.

Une conclusion générale récapitule les principaux résultats de ce travail et ouvre des perspectives sur les axes de recherche qui devraient être abordées afin de (i) renforcer la compréhension des rôles joués par la communauté microbienne dans les environnements de subsurface et (ii) affiner les limites des domaines de viabilité en fonction des paramètres physico-chimiques régnant *in-situ*.

Chapitre I :

Etude bibliographique

1. Les habitats microbiens de subsurface

L'épaisseur de la lithosphère varie de 5 kilomètres, au niveau des fosses abyssales océaniques, à 70 km pour certains massifs continentaux (Madon, 1992; Skinner et al., 1999). En intégrant la totalité du volume de la croûte océanique et de la croûte terrestre, cet environnement souterrain représente l'un des plus importants habitats microbiens existant sur Terre (Whitman et al., 1998).

Généralement, les systèmes de subsurface sont fortement hétérogènes dans leur composition, les basaltes et les granites étant majoritaires respectivement dans les croûtes océanique et continentale, mais aussi d'un point de vue physico-chimique. Fredrickson et Onstott (1996) ont estimé l'augmentation de la température dans la croûte terrestre à 25°C par kilomètre de profondeur (à l'exception de certains gradients géothermiques observés à l'échelle régionale). De même, la pression augmente avec la profondeur : environ 100 bars par km dans la colonne d'eau. La pression géostatique dépend, en plus de la hauteur de la colonne sédimentaire, des contraintes moyennes, *i.e.* de la partie hydrostatique du tenseur, et déviatoriques propre aux faciés étudiés.

Bien que la vie microbienne se déroule majoritairement à la surface, une part significative de cette population est maintenant connue pour coloniser les environnements de subsurface, au-delà de plusieurs centaines de mètres, tels que les sédiments marins profonds, les environnements pétroliers ou encore la croûte terrestre profonde (Ghiorse et Wilson, 1988; Pedersen, 1993). Ainsi, dans leur contexte naturel, la communauté microbienne de subsurface est soumise à des pressions hydrostatiques élevées (supérieures à 100 bars). La température et la pression hydrostatique sont des paramètres importants dans la définition des limites de la vie en subsurface au même titre que la porosité, l'humidité, la disponibilité en sources de carbone et d'énergie (Colwell et al., 1997) ou encore la salinité.

1.1. La biosphère océanique profonde

Certains auteurs (Fry et al., 2008; Whitman et al., 1998) ont estimé que la biosphère profonde océanique contiendrait environ 65% de la biomasse procaryotique globale soit un dixième à un tiers de la biomasse totale de la Terre. Les lieux propices à la présence et au développement de la biomasse

microbienne doivent contenir des donneurs et des accepteurs d'électrons biodisponibles. Les milieux situés aux interfaces des différents états redox répondent le plus souvent à ce critère. Au niveau des fonds océaniques, quatre zones, favorables à la présence de vie microbienne, peuvent être dégagées (Edwards et al., 2005) (figure 1) :

- la zone d'infiltration des eaux marines froides et oxydées dans les roches de la croûte océanique supérieure située principalement près des dorsales océaniques et de leurs flancs mais pouvant être étendue aux zones non sédimentaires et aux affleurements (parties fracturées de la croûte en contact direct avec l'eau de mer),
- la zone de décharge des fluides hydrothermaux chauds (150-350°C) et réduits correspondant aux cheminées hydrothermales (fumeurs noirs et blancs) et autres diffuseurs (suintements),
- les sédiments riches en matières organiques,
- la zone de production abiotique des « géogaz » (H_2 et CO_2), zone dont la localisation exacte reste inconnue.

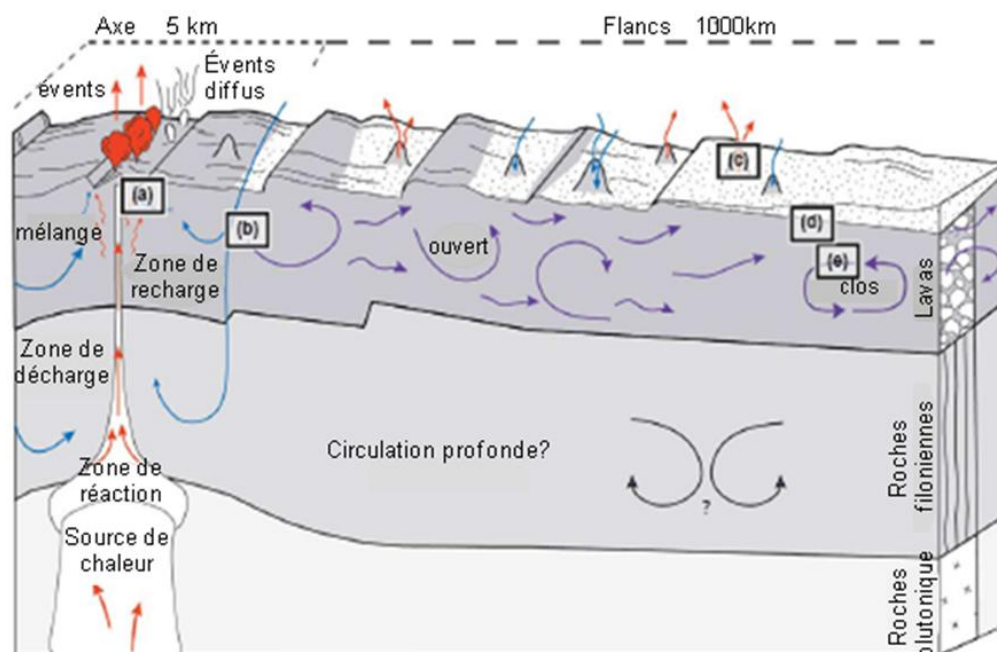


Figure 1. Représentation schématique des circulations de fluides dans la croûte océanique et positionnement des zones favorables à la vie microbienne (d'après Edwards et al., 2005). Les solutions hydrothermales chaudes et réduites se mélangent à l'eau de mer froide et oxygénée au niveau des dorsales médio-océaniques (a) et des autres diffuseurs (c). Dans les zones de recharge (b), l'eau de mer oxygénée s'infiltre dans la croûte océanique. (d) Les sédiments riches en matières organiques peuvent soutenir une communauté d'hétérotrophes et de fermentaires. (e) Une circulation du fluide en système clos permettrait la production abiotique du « géogaz ».

L'épaisseur de la zone habitable des fonds océaniques n'est toujours pas délimitée mais doit être restreinte, en profondeur, par les sources de chaleur magmatique et la faible porosité des roches (Amend et Teske, 2005; Fredrickson et Balkwill, 2006). Les environnements marins profonds accessibles aux microorganismes seraient ainsi réduits aux basaltes volcaniques perméables et aux dépôts compris entre la surface et quelques centaines de mètres de profondeur.

1.1.1. Les environnements de la croûte océanique

En 1998, lors de la campagne ODP⁴ leg 158, l'étude des fluides originaires d'une cheminée hydrothermale active sur la dorsale Atlantique n'a pu démontrer la présence de microorganismes hyperthermophiles endogènes (Reysenbach et al., 1998). Par conséquent, l'existence d'une biosphère endolithique profonde semblerait peu probable au niveau des failles hydrothermales actives (Karl et al., 1988; Reysenbach et al., 1998). Au niveau de ces sites, les sources intenses de chaleur situées en profondeur pourraient ainsi contraindre le développement microbien aux couches superficielles (Amend et Teske, 2005) en contact direct avec l'eau de mer comme les parois des cheminées hydrothermales actives. D'ailleurs, des études microbiologiques ont révélé la prépondérance des communautés archaéennes colonisant les parois des fumeurs actifs (Edward et al., 2005).

A l'inverse, les microorganismes affiliés au domaine *Bacteria* semblent peupler majoritairement les structures froides d'origine hydrothermale (Edward et al., 2005). L'activité microbienne détectée dans ces formations inactives permet d'affirmer la pérennité des communautés bactériennes, même bien après que toutes activités hydrothermales aient cessé.

Les environnements profonds plus tempérés situés à proximité des « points chauds » actifs semblent constituer des niches écologiques plus fertiles.

A l'occasion de la campagne ODP leg 168, l'étude du transect 1023 – 1032, situé sur le flanc est de la dorsale Juan de Fuca (Pacifique), a mis en évidence la circulation de fluides hydrothermaux à travers la croûte océanique basaltique. L'eau de mer percole à travers les dépôts non sédimentés localisés à proximité de la dorsale et des affleurements sédimentés des flancs. Le fluide, confiné sous une couche sédimentaire, subit un chauffage graduel (passant de 10°C à plus de 60°C) et acquiert conjointement une composition proche de celle caractérisant les fluides des cheminées hydrothermales (Davis et al., 1999). Au niveau du site 1026B (ODP leg 186), une communauté procaryotique

⁴ ODP : Ocean Drilling Program

thermophile très diversifiée a été identifiée au sein du fluide circulant (Cowen et al., 2003). Les clones, affiliés aux domaines *Bacteria* et *Archaea*, présentaient des degrés de parenté variables avec des microorganismes sulfato-réducteurs thermophiles (*δ-Proteobacteria*, *Desulfotomaculum*, *Archaeoglobus*), des chimiolithoautotrophes (*Ammonifex degensii*), des fermentaires thermophiles (*Thermotogae*) ainsi qu'avec un phylotype non cultivé appartenant aux *Crenarchaeota* retrouvé dans les sources chaudes de Yellowstone. La mise en évidence de ce consortium microbien à plus de 50 km de la dorsale océanique suggère que la croûte océanique âgée et tempérée pourrait être colonisée par une biosphère hydrothermale profonde dont l'activité métabolique serait plus élevée que celle située au niveau des zones actives des dorsales (Cowen et al., 2003 ; Amend et Teske, 2005).

1.1.2. Les sédiments océaniques profonds

Les sédiments océaniques se caractérisent par leur richesse en donneurs et en accepteurs d'électrons (Amend et Teske, 2005 ; Edward et al., 2005 ; Fry et al., 2008). En fonction de leur teneur en matière organique, des interactions chimiques entre les sédiments et les fluides hydrothermaux percolant peuvent occasionner une augmentation de la température *in-situ* provoquant une pyrolyse des pétroles hydrothermaux et autres composés organiques ainsi qu'une accélération des phénomènes diagénétiques. Ces mécanismes de dégradation induisent une augmentation de la concentration en carbone organique dissous dans les eaux interstitielles, une production abiotique de méthane, d'hydrocarbures et d'acides gras à chaînes courtes (C₁ à C₈) mais aussi d'ammoniac, d'alcanes et d'alcènes (Amend et Teske, 2005). Ces produits de dégradation, d'origine abiotique, représentent des sources potentielles de carbone directement assimilables par les populations microbiennes endogènes des niveaux supérieurs (Amend et Teske, 2005; DeLong, 2004; Edgcomb et al., 2002; Parkes et al., 2000).

Dès 1968, les zones sédimentaires de subsurface, et plus particulièrement les marges continentales profondes bordant l'océan Pacifique, ont été explorées à travers les multiples campagnes de forage DSDP⁵, ODP et IODP⁶.

L'analyse des colonnes sédimentaires marines issues de différentes campagnes de forage a mis en évidence la présence d'un gradient thermique extrêmement variable, impactant directement sur

⁵ DSDP : Deep sea drilling program

⁶ IODP : International ocean drilling program

la biomasse séquestrée dans le sédiment. Par exemple, la diminution de la densité cellulaire mesurée le long de la colonne sédimentaire du site de Bent Hill Massive Sulfide (ODP leg 169 sites 1035) correspondait à une augmentation de température d'environ $0,7^{\circ}\text{C}.\text{m}^{-1}$ ou encore, la brutale chute de biomasse observée après les 15-20 premiers mètres du sédiment a été associée à un gradient thermique plus marqué compris entre 3 et $12^{\circ}\text{C}.\text{m}^{-1}$ (ODP leg 139 et 169 sites 1036) (Cragg et al., 2000 ; figure 2).

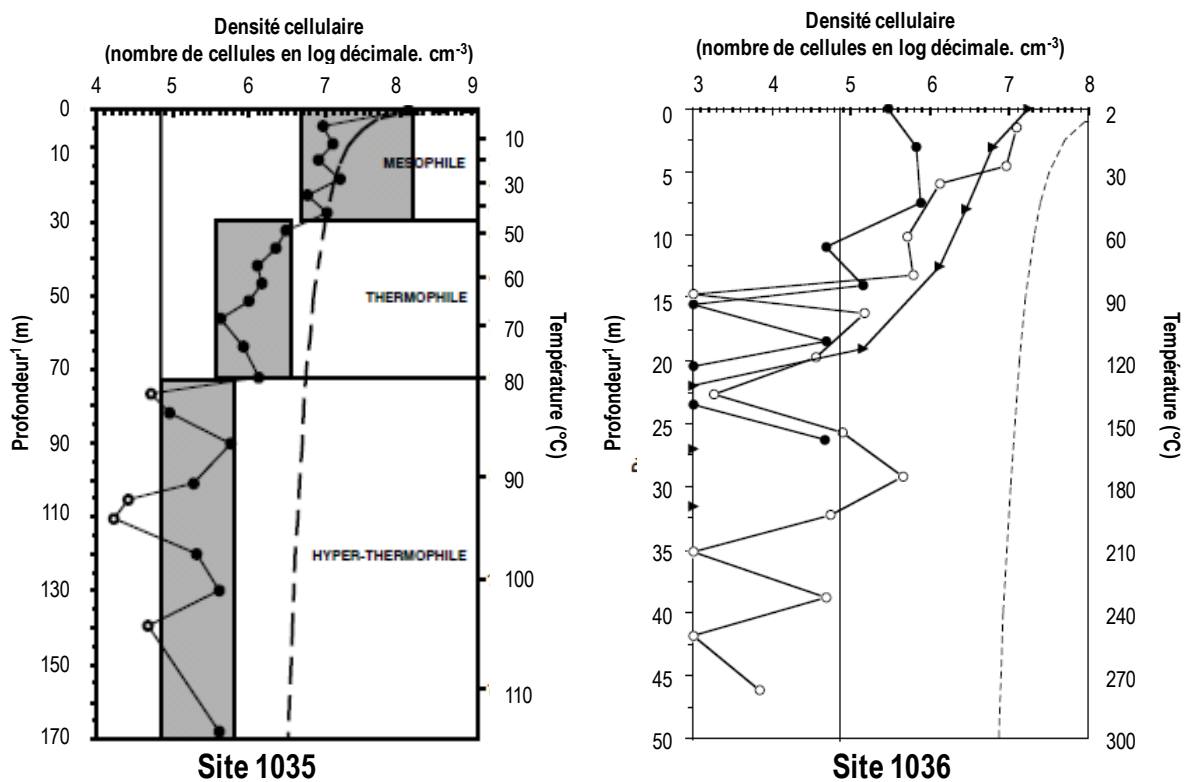


Figure 2. Distribution de la densité cellulaire en fonction de la profondeur au niveau des sites 1035 et 1036 (A cercles pleins, B cercles et C triangles) (Cragg et al., 2000). La ligne en pointillée représente la ligne de régression générale ODP de la densité cellulaire en fonction de la profondeur exprimée par densité cellulaire en log décimal = $7,98 - 0,57 \times \text{Log}_{10} \text{profondeur (m)}$ ($R^2 = 0,561$, $N = 829$). Les symboles localisés sur l'axe vertical indiquent qu'aucune bactérie n'a été détectée.

Cette diminution globale de la population microbienne est induite par la présence de fluides hydrothermaux, fluides dont la température et la toxicité dépendent de la profondeur. Cette tendance a été vérifiée sur plusieurs autres sites, entre autre le Bassin de Guaymas (DSDP leg 64), les marges continentales du Pérou (ODP leg 201) ou de Cascadia (ODP leg 204) (Amend et Teske, 2005; D'Hondt et al., 2004; DeLong, 2004; Fry et al., 2008; Inagaki et al., 2006).

En plus d'influencer la quantité de biomasse, la température et la profondeur régissent la répartition et la composition des populations microbiennes au sein des sédiments (Cragg et al., 2000 ; D'hondt et al., 2004 ; Amend et Teske, 2005 ; Fry et al., 2008). Les communautés microbiennes s'organisent autour du gradient thermique et les types trophiques suivent la distribution et la concentration en accepteurs finaux d'électrons dissous dans la colonne de sédiment. Les populations microbiennes se sont révélées diversifiées avec des compositions et des activités microbiennes variables en fonction des sites et des profondeurs étudiés (Amend et Teske, 2005; Fry et al., 2008; Summit et al., 2000). La respiration microbienne des sulfates s'est révélée beaucoup plus élevée au niveau des marges continentales que des sites en plein océan alors que l'inverse a été constaté pour les activités mangano- et nitrato- réductrices (Aitken et al., 2004; DeLong, 2004). La comparaison des fractions bactériennes et archéennes endémiques des écosystèmes sédimentaires de subsurface par l'utilisation de techniques moléculaires quantitatives a démontré la prépondérance du domaine *Bacteria* (10 à 10000 fois plus abondants) (Fry et al., 2008; Inagaki et al., 2006; Schippers et Neretin, 2006). Cependant, l'étude des échantillons originaires de la campagne ODP leg 201 sites 1227, 1229, et 1230 (Biddle et al., 2006) a décelé la présence d'une communauté procaryotique composée à 82% de microorganismes membres du domaine *Archaea*.

L'importance des activités biogéochimiques de réduction du sulfate et de méthanogénèse dans les sédiments marins profonds ne sont plus à prouver (D'Hondt et al., 2004 ; Fry et al., 2008). Différentes études moléculaires ont mis en évidence l'existence d'une communauté sulfato-réductrice (BSR) restreinte et de distribution hétérogène au sein de la colonne de sédiment. Néanmoins, bien que l'activité de sulfato-réduction semble pérenne au cours du temps (Fry et al., 2008; Webster et al., 2006), la réduction microbienne des sulfates aurait tendance à décroître plus rapidement que la méthanogénèse qui bénéficie d'apports constants en substrats (productions biotique et abiotique). En ce qui concerne les méthanogènes, la taille et la diversité des communautés sont limitées dans la biosphère marine profonde (Fry et al., 2008; Inagaki et al., 2006; Newberry et al., 2004; Parkes et al., 2000; Parkes et al., 2005). La population de BSR et de microorganismes méthanogènes constituent des communautés minoritaires dans la plupart des environnements sédimentaires océaniques profonds.

De manière générale, l'activité microbienne diminue avec l'augmentation de la profondeur. Il existe cependant des zones qui ne répondent pas à cette règle (D'hondt et al., 2004 ; Delong et al., 2004 ; Fry et al, 2008) :

- dans les couches profondes, lors de l'accumulation de méthane en présence de faible concentration en sulfate (formation d'hydrate de méthane), il peut se produire une oxydation anaérobie du méthane (OAM),
- dans les aires sédimentaires où s'accumulent le méthane mais aussi l'acétate et les géogaz liés à la méthanogénèse autotrophe, une stimulation de l'activité OAM peut aussi avoir lieu,
- aux niveaux inférieurs et supérieurs des zones de transition sulfate/méthane où le potentiel d'oxydo-réduction standard est inversé par l'apport de sulfate,
- dans les zones de subsurface éloignées du plancher océanique enrichies en Mn et Fe dissous,
- à l'interface sédiment/roche basaltique où une circulation d'eau de mer oxique peut soutenir une communauté procaryotique aérobie alors qu'une population microbienne anaérobie se développe dans les couches supérieures.

L'organisation globale des communautés microbiennes présentes le long d'une colonne sédimentaire océanique est schématisée dans la figure 3.

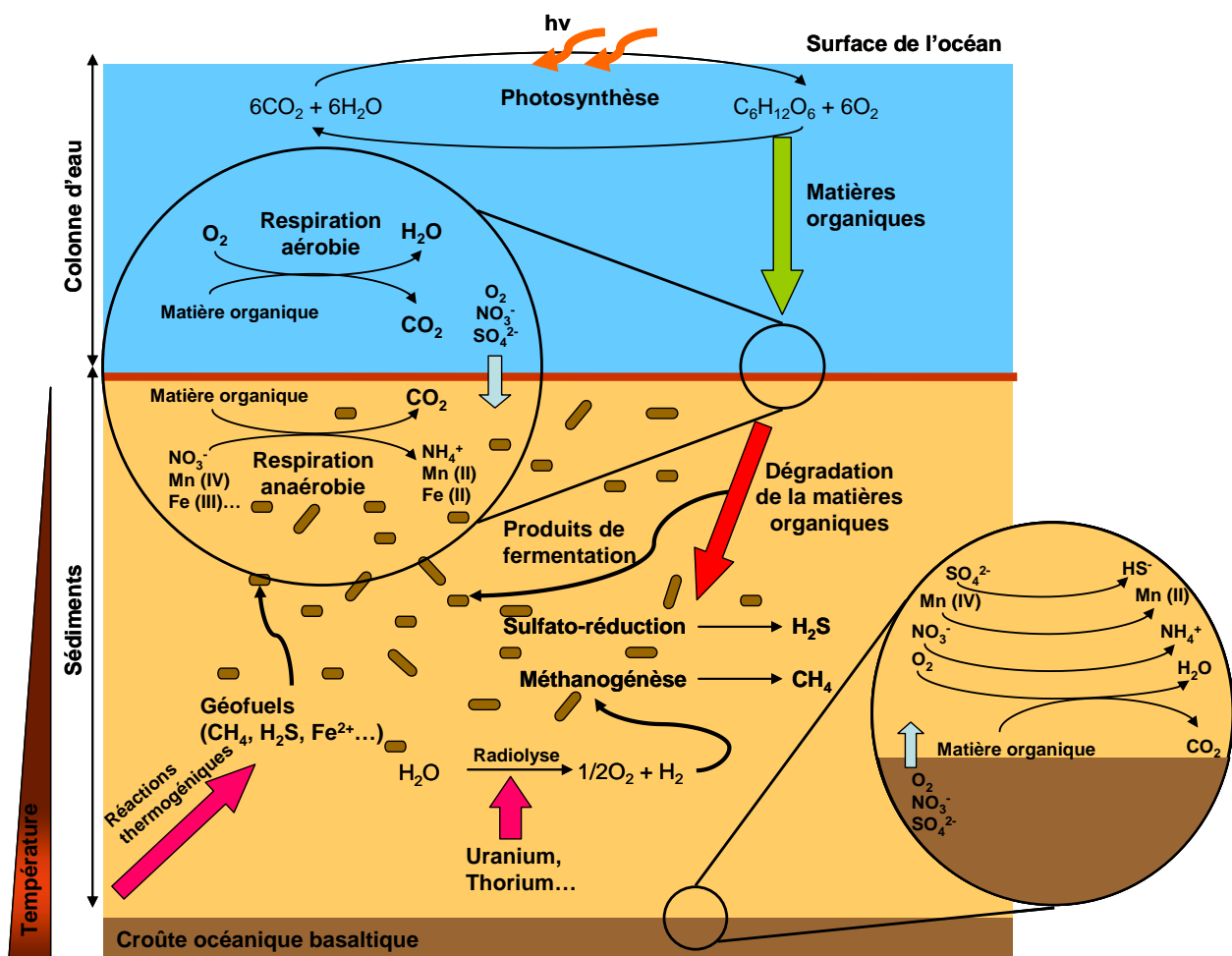


Figure 3. Représentation schématique de la distribution des sources d'énergie biodisponibles dans les sédiments marins profonds (d'après Delong, 2004 et Amend et Teske, 2005).

A ce jour, aucune corrélation solide n'a été établie entre la composition microbienne et la lithologie des sédiments marins profonds et seule une étude relate une interdépendance entre la biodiversité détectée, les activités procaryotiques et les profils géochimiques relevés *in-situ* (Fry et al., 2006). De manière générale, les profils géochimiques constatés pourraient être contrôlés par l'activité d'une fraction de la population procaryotique totale ou par des microorganismes dont les séquences de gène sont inconnues ou ne seraient pas reconnues par les amorces utilisées. Des composés organiques, autre que le méthane, pourraient subvenir majoritairement aux besoins en source de carbone des populations *Archaea*. Il est également envisageable que les métabolismes hétérotrophes de microorganismes non cultivés soient importants dans la biosphère océanique profonde (Fry et al., 2008). L'isolement de genres microbiens aérobies comme anaérobies facultatifs et anaérobies stricts (Amend et Teske, 2005) supporte l'hypothèse, anciennement énoncée par Cragg et al. en 1990, que la plupart des microorganismes hétérotrophes affiliés au domaine *Bacteria* peuplant la subsurface profonde serait anaérobie facultatif. Par conséquent, la biomasse produite par la communauté procaryotique hétérotrophe serait probablement équivalente à celle produite par la population microbienne chimiolithoautotrophe (Amend et Teske, 2005; Bach et Edwards, 2003; Fry et al., 2008). De plus, les populations colonisant les sites actifs et les environnements de subsurface plus tempérés (compris entre 20 et 50°C) renferment certains caractères physiologiques et génétiques communs. Ainsi, les populations microbiennes des environnements océaniques de subsurface seraient spécifiquement adaptées aux conditions *in-situ* et parfois uniques des habitats profonds (Fry et al., 2008; Huber et al., 2002; Huber et al., 2006).

1.2. Les environnements pétroliers

Les systèmes pétroliers profonds recèlent également des microorganismes endogènes spécifiques. Durant ces 30 dernières années, les recherches menées sur les réservoirs pétrolifères ont montré que ces écosystèmes de subsurface abritaient des communautés procaryotiques complexes et métaboliquement actives. De nombreux microorganismes ont été isolés à partir d'eau de gisements pétrolifères et parmi eux, de nouvelles espèces bactériennes qui n'avaient jamais été décrites. Les métabolismes les plus fréquemment rencontrés correspondent à la sulfato-réduction, la méthanogénèse et la fermentation.

La formation des systèmes pétroliers ou genèse pétrolière requiert l'association de trois éléments géologiques : une roche mère, une roche couverture et une roche réservoir (figure 4). Tout

d'abord, la naissance du pétrole brut s'effectue dans une roche « mère », riche en matières organiques fossiles, sous l'action des fortes pressions (supérieures à 400 bars) et températures (entre 50 et 200°C) atteintes durant l'enfouissement. Les fluides et gaz produits sont ensuite expulsés et commencent leur ascension vers la surface. Cette migration est parfois arrêtée par un piège géologique constitué d'une roche réservoir surmontée d'une roche de couverture, empêchant toute remontée vers le haut. Les roches de couverture, les plus fréquemment rencontrées, sont des argiles, des marnes ou encore des évaporites qui représentent des faciès géologiques imperméables et ductiles. Quant aux roches réservoirs, ce sont des roches poreuses et perméables, telles que les grés, les calcaires et les craies, capables de stocker d'importants volumes de gaz et de fluide (Planckaert, 2005). Dans les écosystèmes pétroliers, la colonisation microbienne se localiserait aux niveaux des zones d'interfaces entre les hydrocarbures liquides et l'eau de formation dans les roches réservoirs.

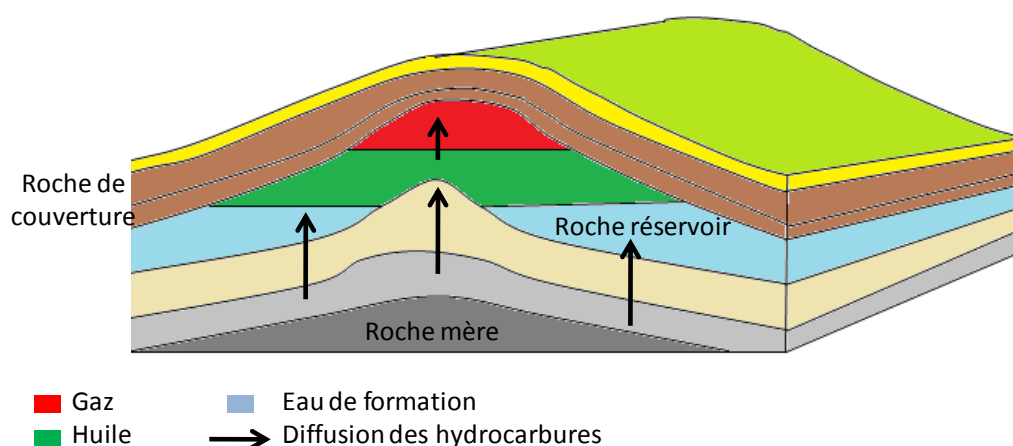


Figure 4. Représentation schématique de l'accumulation d'hydrocarbures dans un piège géologique de type anticline (Planckaert, 2005). La localisation de la roche « mère » par rapport à la roche réservoir est hypothétique.

1.2.1. Les métabolismes microbiens majoritairement retrouvés

La sulfato-réduction

La première présomption de l'existence de BSR dans les environnements pétroliers a été émise en 1926 (Bastin, 1926). Depuis, de nombreuses espèces ont été isolées. Bien que la fraction de cette population varie d'un écosystème à l'autre, une diminution de la communauté de BSR a été corrélée à une augmentation de la température *in-situ* ainsi qu'à un enrichissement en sels des eaux de production. Aucune BSR n'a été détectée dans les environnements pétroliers dont la température

excédait 85°C (Birkeland, 2005). De plus, les BSR les plus halophiles isolées de ces systèmes ont été caractérisées comme des bactéries mésophiles (Dang et al., 1996; Magot et al., 2004; Tardy-Jacquenod et al., 1998). Dans les écosystèmes pétroliers, la majorité des microorganismes sulfato-réducteurs mésophiles ont été identifiés comme membres de la classe des *δ-Proteobacteria*. Les BSR thermophiles sont plus hétérogènes et ont été le plus souvent affiliées aux genres *Desulfotomaculum*, *Thermodesulforhabdus*, *Thermodesulfobacterium* et *Desulfacinum* (Magot et al., 2000). Dans le domaine *Archaea*, seules quelques sulfato-réductrices hyperthermophiles, affiliées au genre *Archaeoglobus*, ont été détectées dans les systèmes pétroliers (Stetter et al., 1993).

La méthanogénèse

La méthanogénèse est un processus microbien ubiquitaire des milieux pétroliers peu profonds où règnent des températures peu élevées (Jones et al., 2008). A ce jour, aucune méthanogène hyperthermophile ou combinant la thermophilie et l'halophilie n'a été isolée à partir d'eaux de gisements pétrolifères (Jeanthon et al., 2005). La phylogénie des espèces méthanogènes hydrogénotrophes a révélé leur appartenance aux ordres des *Methanobacteriales*, des *Methanomicrobiales* et des *Methanococcales* du domaine *Archaea*. Parmi les *Methanomicrobiales*, l'*Archaea* mésophile *Methanocalculus halotolerans* représente la seule espèce méthanogène hydrogénotrophe capable de se développer à des concentrations en NaCl supérieures à 12,5% (Ollivier et al., 1998). Des méthanogènes méthylotrophes et acétoclastiques ont également été détectées dans certains systèmes pétroliers ; elles sont regroupées dans l'ordre des *Methanosarcinales* (Jeanthon et al., 2005).

La fermentation

Les microorganismes fermentaires semblent représenter la fraction procaryotique endogène la plus importante des environnements pétroliers. Une grande variété de microorganismes fermentaires mésophiles et thermophiles, pour la plupart appartenant au domaine *Bacteria*, ont été isolés d'eau de formation de ces écosystèmes de subsurface. Seules quelques *Archaea* fermentaires hyperthermophiles, et affiliées à l'ordre de *Thermococcales* (*Thermococcus* et *Pyrococcus*), ont été mises en évidence de réservoirs profonds dont les températures étaient supérieures à 80°C (Stetter et al., 1993 ; L'Haridon et al., 1995). Bien que les systèmes pétroliers profonds soient généralement hypersalés, aucun procaryote fermentaire halophile extrême n'a encore été isolé (Ollivier et Cayol, 2005). A l'heure actuelle, la bactérie *Halotheomothrix orenii* représente la seule bactérie halophile thermophile capable de croître à 70°C en présence de concentrations en NaCl comprises entre 40 et

200 g.L⁻¹ (Cayol et al., 1994). Néanmoins cette bactérie n'est pas originaire d'environnement profond mais de sédiments de surface d'un lac hypersalé (Tunisie).

La majorité des bactéries mésophiles anaérobies hétérotrophes isolée d'eaux de gisements pétroliers a été décrite comme des halophiles faibles à modérées, à l'exception de la bactérie halotolérante *Fusibacter paucivorans*. Les bactéries fermentaires mésophiles sont affiliées aux genres *Halanaerobium*, *Spirochaeta* et *Dethiosulfovibrio*, également capables de réduire le thiosulfate. Il est à noter que la réduction du thiosulfate a également été observée chez *Fusibacter paucivorans* (Ravot et al., 1999). Du fait que de nombreux réservoirs pétroliers se situent à de grandes profondeurs, les températures *in-situ* sont très élevées. Par conséquent, des bactéries fermentaires thermophiles ont été fréquemment détectées. Ces dernières sont affiliées, pour un grand nombre, à la famille *Thermoanaerobiaceae*, incluant les genres *Thermoanaerobacter* et *Thermoanaerobacterium*, ainsi qu'à l'ordre des *Thermotogales*, et plus particulièrement, aux genres *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Petrotoga* et *Geotoga*. Les bactéries affiliées aux genres *Petrotoga* et *Geotoga* ont été uniquement détectées dans les environnements pétroliers, leur conférant ainsi un caractère endogène (Ollivier et Cayol, 2005). Bien que retrouvés dans divers biotopes extrêmes (sources chaudes, événements hydrothermaux), les microorganismes appartenant aux genres *Thermotoga* et *Thermoanaerobacter* ont été fréquemment détectés dans les eaux de réservoirs pétroliers, suggérant indirectement leur caractère natif. Il est également important de souligner que de nombreux microorganismes fermentaires, des domaines *Bacteria* et *Archaea*, se sont révélés capables de réduire le fer(III), en utilisant le dihydrogène comme donneur d'électrons, ou le thiosulfate. Ces observations ont démontré que l'oxydation de l'hydrogène moléculaire n'était pas limitée aux méthanogènes et BSR uniquement et que la corrosion des aciers pouvait être causée par des microorganismes fermentaires.

La chaîne trophique anaérobie des environnements pétroliers serait donc basée sur la consommation de composés organiques par les fermentaires et les BSR hétérotrophes ainsi que sur l'utilisation de l'hydrogène moléculaire et des carbonates par les méthanogènes et les BSR hydrogénotrophes (Magot, 2005). Malgré des conditions anoxiques, des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs ont également été détectés dans les eaux de production de gisements pétroliers (Xue et al., 2003) ainsi que dans les roches réservoirs (Von Der Weid et al., 2008).

1.2.2. Contraintes physiques et événements géologiques

En se basant sur la découverte d'un microorganisme capable de croître à 121°C, certains auteurs ont suggéré qu'il était possible de rencontrer de la vie dans les écosystèmes pétroliers situés

jusqu'à 4000 mètres de profondeur (Guerrero, 1998). Toutefois, certaines données évoquent une température limite de vie beaucoup plus basse. Tout d'abord, les différentes observations issues des études microbiologiques réalisées sur des eaux de gisements pétroliers suggèrent une diminution drastique de la population microbienne devenant négligeable voire nulle dans les réservoirs dont les températures *in-situ* dépassent 82°C (Bernard et al., 1992; Grassia et al., 1996). De plus, dans certains cas, l'association de paramètres physico-chimiques tels que la température et la salinité réduirait les plages de croissance. Ensuite, une augmentation de la concentration en acides gras dans les eaux de formation a été constatée conjointement à une augmentation de la température *in-situ* des réservoirs (Fisher, 1987). Cette augmentation en acides gras serait provoquée par une biodégradation moins importante de ces composés organiques. Les teneurs maximales en acides gras ont été relevées à des températures comprises entre 80 et 90°C, gamme de températures caractéristiques des plus faibles niveaux d'activités procaryotiques (Magot et al., 2005). Enfin, la biodégradation des hydrocarbures n'a jamais été observée dans les réservoirs pétroliers dont les températures *in-situ* étaient supérieures à 82°C (Philippi, 1977). Il existe aussi des réservoirs pétroliers contenant des huiles non biodégradées et dont les températures *in-situ* sont beaucoup plus basses. En ce qui les concernent, ces réservoirs auraient subi une remontée des bassins sédimentaires, passant de régions profondes très chaudes vers des zones de surface plus tempérées (Wilhelm et al., 2001) (figure 5). L'histoire géologique des faciès à des températures extrêmement chaudes aurait pasteurisé voir stérilisé ces écosystèmes de toute trace de communauté procaryotique endogène, provoquant une « paléostérilisation ».

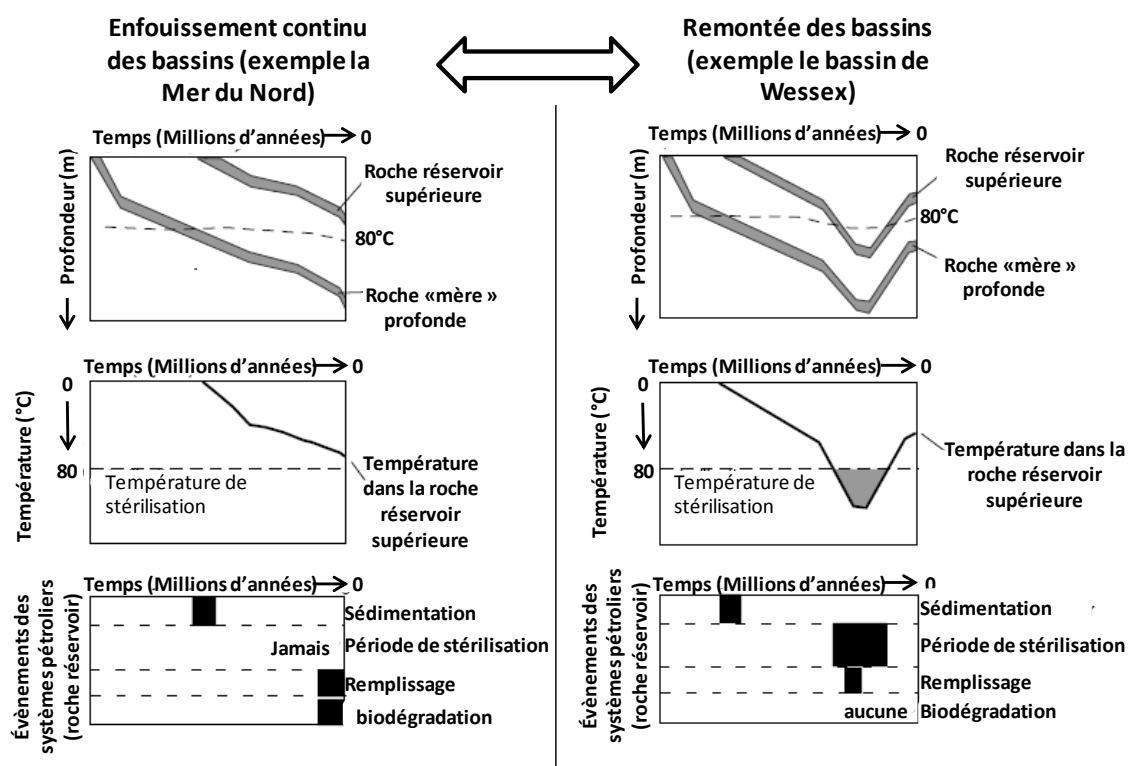


Figure 5. Comparaison de deux systèmes pétroliers, l'un soumis à une subsidence⁷ continue et l'autre à une remontée du bassin (Wilhelm et al., 2001). Les graphiques schématisent l'histoire géologique (haut), l'histoire thermique (milieu) et les événements géologiques ayant eu lieu dans les deux types d'environnements pétrolifères.

Depuis la fin des années 1980, des populations microbiennes diversifiées ont été détectées dans des milieux très variés du sous-sol et ce jusqu'à des profondeurs supérieures à 3 km. Bien que la microbiologie des environnements continentaux profonds reste encore un domaine marginal, il semblerait que certaines espèces soient ubiquitaires de la biosphère tant continentale qu'océanique. En contrepartie, la composition et la distribution verticale de ces deux écosystèmes paraissent distinctes.

1.3. La biosphère continentale profonde

D'un point de vue géologique, la lithosphère est constituée de roches ignées issues du refroidissement du magma, de roches sédimentaires ayant pour origine l'accumulation, la compaction et la cimentation biotique ou abiotique de sédiments (lithification) et de roches métamorphiques produites sous l'action de la pression et de la température sur les types de roches précédemment citées. Les roches sont perpétuellement soumises à l'altération de leurs minéraux. Les causes de ces modifications sont physiques (température), chimiques (lessivage des sols) ou encore le résultat de l'activité biologique, différents procaryotes possédant la capacité de coloniser la surface et l'intérieur des roches (Fajardo-Cavazos et Nicholson, 2006). Les écosystèmes continentaux profonds sont principalement reconnus comme anoxiques à l'exception de rares aires oxygénées (aquifères, sites radioactifs) (Kotelnikova, 2002; Oborin et al., 2008; Pedersen, 2000). Ces communautés s'organisent en zones en fonction des conditions physico-chimiques favorables à leur développement (Costerton et al., 1994).

Selon le concept d'Oborin et al (2008), la biosphère profonde moderne, strictement limitée à la croûte continentale, s'organise en trois parties (figure 6) :

- la zone supérieure (inférieure à 1000 mètres de profondeur) occupée par le « filtre bactérien oxydant les hydrocarbures ». Les communautés microbiennes endogènes y forment une chaîne trophique incluant les métabolismes chimiolithotrophes, hétérotrophes et aérobies. Les hydrocarbures sont oxydés en CO₂ et en eau, CO₂ lui-même réutilisé comme substrat par les microorganismes autotrophes.

⁷ Subsidence : affaissement lent de la surface de la croûte terrestre sous l'effet d'une charge

- La zone inférieure située au delà de 3500 mètres sous la surface de la terre jusqu'à la limite inférieure de la vie (de localisation inconnue) appelée zone du filtre bactérien H_2 - CO_2 . Les microorganismes chimolithotrophes utilisant activement les géogaz, issus des fluides du manteau, y seraient largement retrouvés.
- La zone intermédiaire comprise entre 1000 et 3500 mètres de profondeur nommée « Naphthidiobiose », terme indiquant la synthèse d'hydrocarbures liquides et gazeux par des microorganismes. Les principales populations microbiennes impliquées dans ce processus sont les méthanogènes, les sulfato-réductrices et probablement les acétogènes. Les sources de carbone et d'hydrogène proviendraient de matières organiques originaires soit de la surface (par photosynthèse) soit de la zone inférieure (par migration/diffusion) et de géogaz. La Naphthidiobiose n'est pas ubiquitaire et possède un caractère local dont la distribution est associée à la présence de fissures et de failles.

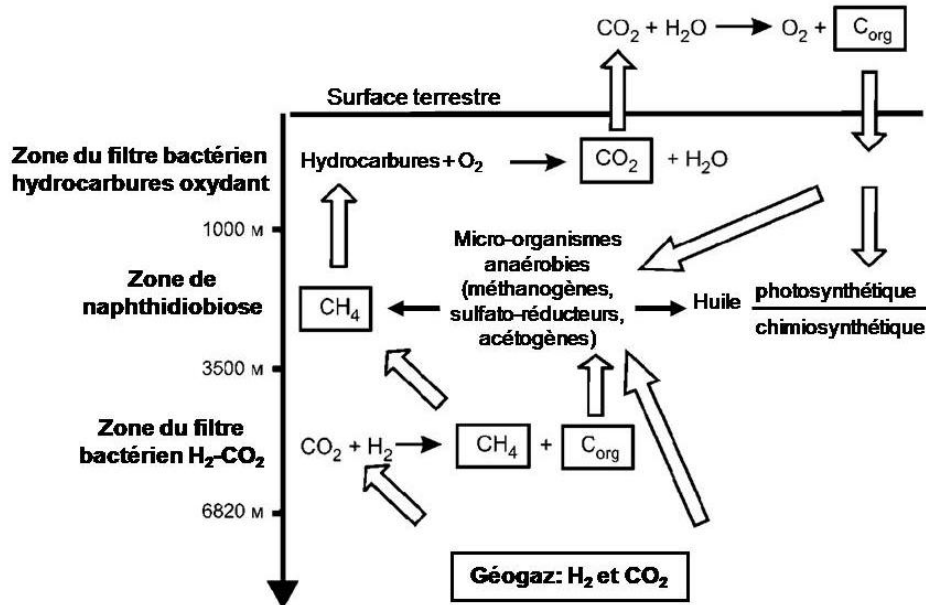


Figure 6. Organisation structurale des biotopes de subsurface et des flux de carbone dans la croûte terrestre (Obolin et al., 2008).

Les environnements de subsurface terrestres peuvent être classés en trois groupes distincts : les aquifères circulant dans les roches terrestres sédimentaires et ignées⁸, les aquitards et les dépôts salés anciens (Fish et al., 2002; Pedersen, 1993).

⁸ Roches ignées : roches formées par refroidissement et solidification du magma, également désignées sous le terme de roches magmatiques.

1.3.1. Les aquifères

Les aquifères sont généralement des environnements oligotrophes où l'activité microbienne ainsi que la taille et la densité cellulaire sont réduites. Ces écosystèmes sont également très hétérogènes (minéralogie, granulométrie, porosité, ...). Selon, Goldscheider et al. (2006) « les aquifères peuvent être considérés comme un assemblage d'habitats hétérogènes à l'échelle macro- et microscopiques ». Les eaux souterraines profondes contiennent aussi une grande quantité de gaz dissous. Ces gaz participent à l'équilibre chimique des aquifères et influencent l'activité microbienne *in-situ* (Pedersen, 1993). D'un point de vue structurel, les aquifères circulant dans les roches sédimentaires diffèrent grandement de ceux contenus dans les roches ignées et métamorphiques, généralement fracturées. La stratification horizontale des sédiments compartimente les aquifères dans des faciès géologiques poreux (grés, calcaire...). L'intercalation de couches faiblement perméables (aquitards) entre les formations détritiques poreuses individualise les aquifères en retardant leur flux et oblige un écoulement horizontal des eaux souterraines. A l'inverse, les aquifères des roches fracturées circulent à travers un réseau de failles et de fractures orientées aussi bien horizontalement que verticalement (Pedersen, 1997).

De ce fait, le volume poral régit la colonisation ainsi que l'activité microbienne des environnements de subsurface (Fredrickson et al., 1997). Les espaces colonisables des aquifères sédimentaires sont étroits et souvent non consolidés (Goldscheider et al., 2006). Au contraire, le réseau de fractures présent dans les roches ignées offre un volume plus favorable au développement procaryotique (Stevens, 1997). Néanmoins, seules quelques fractures dominent les flux de fluides, de nutriments et de microorganismes (Pedersen, 1993, 1997).

Enfin, les communautés procaryotiques peuvent être planctoniques ou attachées aux matériaux de l'aquifère (Goldscheider et al., 2006). Cependant plusieurs études ont démontré que la biomasse bactérienne vivait majoritairement adsorbée sur les matrices rocheuses et les particules en suspension (Hazen et al., 1991; Pedersen, 1993; Stevens et al., 1993). De plus, la croissance microbienne sous forme de biofilm serait conditionnée par le débit des aquifères. La production de biofilm engendre un risque de colmatage de l'aquifère réduisant ainsi son débit. Ce phénomène provoquerait une diminution du développement microbien jusqu'à un seuil critique où les microorganismes ne pourraient plus croître mais seulement se maintenir (Pedersen, 1993). Par conséquent, les microorganismes endogènes des environnements de subsurface, impliqués dans le cycle de la matière organique, influencent la chimie

des eaux (azote, soufre, fer, dissolution et précipitation des minéraux...). Ils jouent donc un rôle essentiel dans la qualité des aquifères.

1.3.1.1. Les aquifères des roches ignées et métamorphiques

Les roches ignées constituent la catégorie de roche la plus abondante retrouvée dans la croûte continentale. Ces roches, ainsi que les roches métamorphiques, ayant été soumises à des températures et/ou pressions élevées à un moment de leur formation, sont généralement carencées en matière organique (Fredrickson et Balkwill, 2006). Cependant, une production géochimique de dihydrogène (H_2), par contact entre l'eau souterraine anoxique et les roches réactives, par radiolyse de l'eau ou encore résultant de l'activité volcanique, offre une source énergétique alternative directement disponible dans les fluides circulants (Pedersen, 2000).

Les microorganismes colonisent la plupart des aquifères profonds et ce jusqu'à plus de 4000 mètres de profondeur (Lin et al., 2006; Pedersen, 2000; Stevens et al., 1993; Szewzyk et al., 1994). Plusieurs sites d'étude existent pour l'exploration des aquifères continentaux. L'un des aquifères les plus étudiés est certainement celui du laboratoire souterrain d'Äspö Hard Rock (HRL⁹) dans le Bouclier Fennoscandien (Suède). La prospection de l'aquifère granitique d'Äspö HRL, situé à 460 mètres de profondeur, a révélé la présence d'une communauté procaryotique abondante (10^5 à 10^6 cellules.mL⁻¹ en moyenne) (Amend et Teske, 2005). Une grande diversité métabolique a été détectée au sein de cette population microbienne endogène, composée de microorganismes hétérotrophes et autotrophes incluant à la fois des méthanogènes autotrophes et acétoclastiques, des homoacétogènes, des méthanotrophes et des bactéries sulfato- et ferri- réductrices (Pedersen, 1997). L'étude de Kotelnikova et Pedersen (1998) a démontré par la suite, que cet écosystème était majoritairement constitué d'homoacétogènes et de méthanogènes autotrophes et acétoclastiques. Ce résultat étaye la théorie proposée par Pedersen (1993, 1997) sur le cycle de la matière organique au sein des aquifères granitiques profonds. Ce postulat, basé sur l'indépendance du système face à la photosynthèse de surface, repose sur l'utilisation du dihydrogène, comme source primaire d'énergie, et du CO_2 , comme principale source de carbone, par les métabolismes hydrogénotrophes (figure 7).

⁹ HRL : Hard Rock Laboratory

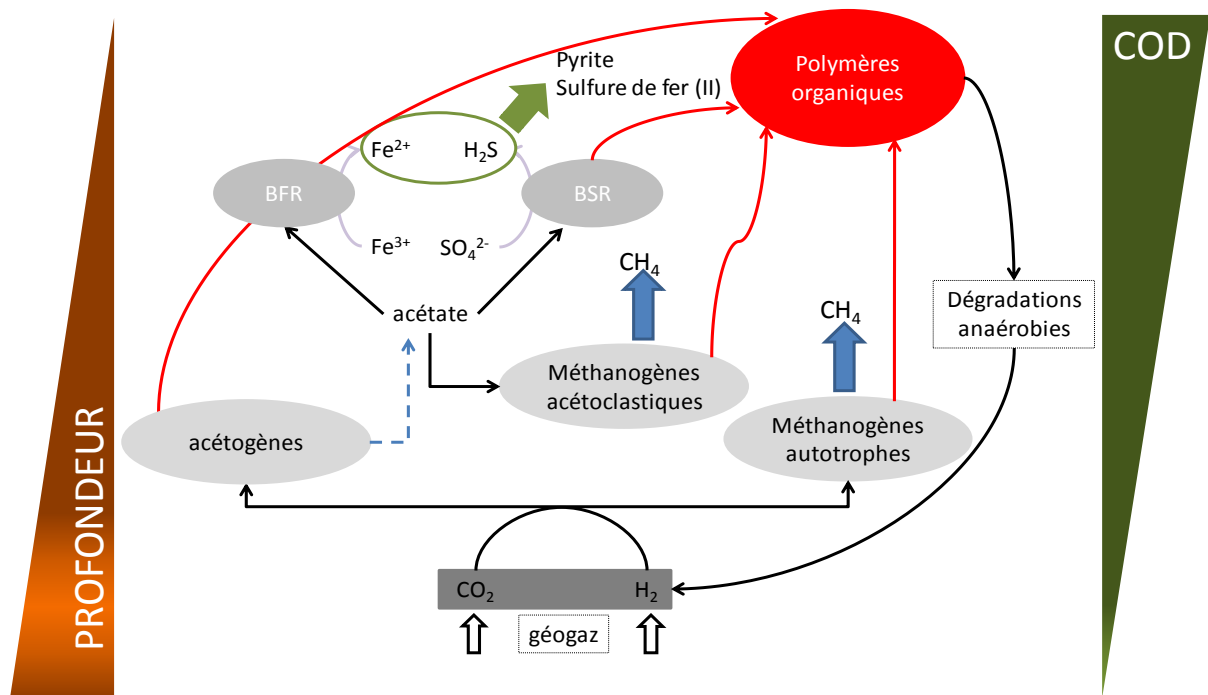


Figure 7. Représentation schématique du cycle de la matière organique au sein des aquifères granitiques profonds (d'après Pedersen, 1997). BSR : bactéries sulfato-réductrices, BFR : bactéries ferri-réductrices.

La base de la chaîne trophique (ou production primaire) est associée aux métabolismes autotrophes dominants, en l'occurrence ceux de la méthano- et de l'acéto- gène. L'acétate formé est ensuite consommé par dismutation ou respiration anaérobie, réactions assurées par des communautés de méthanogènes acétoclastiques et de procaryotes sulfato- et ferri-réducteurs. Enfin, l'ensemble de cette biomasse synthétisée sera elle-même consommée par une population de microorganismes hétérotrophes anaérobies. Par conséquent, les produits des différents métabolismes induiraient une compartimentation de la chaîne trophique anaérobie en fonction de la profondeur et l'augmentation de la biomasse totale engendrerait un accroissement des teneurs en carbone organique dissous (COD) mesurées dans les eaux des aquifères granitiques.

Des preuves, argumentant en faveur de ce modèle, peuvent être citées. Des concentrations significatives en H_2 , CO_2 et méthane ont été mesurées dans les eaux souterraines d'Äspö, concentrations supérieures à celles généralement détectées dans les environnements de surface (Pedersen, 1997 ; Kotelnikova, 2002). Les concentrations en H_2 sont apparues comme suffisantes pour supporter l'activité métabolique des producteurs primaires (Kotelnikova et Pedersen, 1997) (tableau 1).

Tableau 1. Teneurs en dihydrogène et en biomasses totales dans différents environnements (D'après Kotelnikova, 2002).

Localisations	Concentration en H ₂	Biomasses totales (cellules.mL ⁻¹ ou .g ⁻¹ de sol)
<i>Environnements de subsurface</i>		
Bouclier Fennoscandien	60 µM – 28 mM	ND
Bouclier Canadien	10 µM – 300 mM	ND
Aquifère granitique d'Äspö	0,05 – 100 µM	10 ⁵ - 10 ⁶
Aquifère basaltique de Columbia River	0,01 – 100 µM	10 ³ - 10 ⁴
Aquifère basaltique de Lidy Hot	13 nM	10 ⁵
Aquifère metabasaltique de Mponeng	1940 – 3715 µM	10 ⁴
<i>Environnements de surface</i>		
Atmosphère	0,41 nM	ND
Sols	533 nM	10 ⁷ – 10 ⁹
ND : non déterminé		

La disponibilité en H₂ constituerait le maillon essentiel à l'émergence, la propagation et la persistance de la chaîne trophique dans les aquifères profonds des roches ignées (Amend et Teske, 2005). Une composition isotopique anormale en ¹³C a également été détectée dans le méthane séquestré dans les formations granitiques d'Äspö, suggérant une origine biogénique de ce méthane lourd (Kotelnikova, 2002).

Outre la conversion du carbone inorganique en molécules biologiques, deux autres processus/réactions biogéochimiques ont été démontrés dans les aquifères granitiques profonds d'Äspö. Il s'agit de la mobilisation du fer ferrique de la phase solide vers la phase aqueuse sous forme de fer ferreux par des bactéries ferri-réductrices hétérotrophes et de la réduction des sulfates en sulfures par des BSR, limitée aux eaux souterraines de faible salinité (de l'ordre de 1%) (Pedersen, 1997). Des réducteurs de Fe(III) affiliés à *Shewanella putrefaciens* ainsi qu'au genre *Pseudomonas* ainsi que des microorganismes sulfato-réducteurs appartenant aux genres *Desulfomicrobium* et *Desulfovibrio* ont été identifiés (Banwart et al., 1996; Banwart, 1999; Pedersen et al., 1996). En 2008, (Hallbeck et Pedersen, 2008) ont évoqué une potentielle sous-estimation de l'activité de sulfato-réduction, lors d'expérimentations *in-situ* dans un système batch/chemostat réversible. L'interaction entre le Fe(II) et l'H₂S produits par les BFR et les BSR (figure 7) provoquerait la formation de sulfures

de fer(II) solide et une diminution de la concentration en sulfures gazeux dans les aquifères de subsurface.

Bien que les écosystèmes de subsurface soient considérés comme des environnements anoxiques, une activité aérobie a été détectée dans les aquifères d'Äspö HRL (Pedersen, 1993, 1997 ; Kotelnikova, 2002). Des méthanotrophes, affiliés aux genres *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylococcus*, *Methylobacter* et *Methylocystis* ont été isolés de zones aérobies (10^2 à 10^3 cellules.mL⁻¹). Cependant, la présence d'une communauté réduite de méthanotrophes, métaboliquement actives, a également été prouvée dans les eaux souterraines anoxiques de cette formation granitique (Kotelnikova, 2002). L'oxydation du méthane serait donc responsable d'une part significative de la consommation de l'O₂ dans les aquifères granitiques de subsurface (Kotelnikova et Pedersen, 1998). De plus, Pedersen et al. (2008) ont suggéré que la plupart des microorganismes endogènes des environnements profonds pourraient être détectés comme des anaérobies facultatifs.

D'autres aquifères granitiques profonds ont été également étudiés. Dans le Bouclier Canadien, la détection de dépôts de gaz naturel présentant des signatures isotopiques d'origine microbienne a suggéré l'existence d'un écosystème microbien lithoautotrophe de subsurface (SLiME pour Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystem) (Stevens, 1997). Toutefois, l'étude microbiologique des eaux, bien qu'ayant révélé l'existence d'une population anaérobie composée d'hétérotrophes, de dénitrifiantes et de sulfato-réductrices ainsi que la présence de bactéries fixatrices d'azote, n'a pas décelé de méthanogènes (Jain et al., 1997).

Dans le cas des aquifères de Stripa (Suède), une majorité de microorganismes appartenant au phylum des *Proteobacteria* a été mise en évidence dans les eaux souterraines comprises entre 970 et 1240 mètres de profondeur (Pedersen, 1993). Sur le même site d'étude, mais à des profondeurs bien plus importantes (3900 et 4200 mètres de profondeur), Szewzyk et al. (1994) ont démontré l'existence de bactéries fermentaires thermophiles incluant certains isolats affiliés au genre *Thermoanaerobium*. En revanche, aucune BSR ni méthanogène n'a été détectée.

Dans des études menées sur des aquifères profonds situés en Finlande, des zones présentant à la fois les profils géochimiques et les activités métaboliques fréquemment retrouvés dans les sédiments marins profonds ont été identifiées, notamment l'existence de régions riches en méthane et pauvres en sulfates correspondant aux aires d'oxydation anaérobie du méthane (Haveman et al., 1999; Pedersen et al., 2008). Il est également arrivé que de nouveaux taxons bactériens soient découverts comme par exemple dans la mine d'Henderson (Colorado, USA) (Sahl et al., 2008).

Des recherches similaires ont été menées dans des aquifères basaltiques, notamment ceux de la Columbia River Basalt (CRB) dans le nord-ouest des Etats Unis (Stevens et McKinley, 1995; Stevens et

al., 1993). Une communauté microbienne et une concentration en dihydrogène équivalentes à celles retrouvées dans les aquifères d'Äspö ont été détectées dans les eaux souterraines de la CRB. En 1995, Stevens et McKinley en ont conclu que la production de dihydrogène provenait des interactions entre l'eau souterraine anoxique et les basaltes mafiques (riches en Mg et en Fe) et felsiques (riche en SiO₂) et qu'elle subvenait aux besoins d'un écosystème basé sur des métabolismes H₂-dépendants (analogue au modèle de Pedersen). *A contrario*, des réticences face à l'existence de cette biosphère ont été exprimées, suggérant que la chimie du milieu ne pouvait pas fournir assez d'H₂. Basé sur l'étude de Fry et al. (1997), et plus particulièrement sur la prépondérance du domaine *Bacteria* (en opposition avec les premières études), ainsi qu'en réinterprétant les données de COD (Stevens et McKinley, 1995), un écosystème fondé sur l'oxydation de la matière organique a été proposé pour les eaux souterraines de la CRB (Anderson et al., 1998). Néanmoins, des recherches ultérieures menées sur la production abiotique de dihydrogène à partir des interactions eau/basaltes suggèrent que l'altération des laves mafiques générerait des concentrations suffisantes en H₂ pour supporter un SLiME dans la CRB (Stevens et McKinley, 2000).

D'autres sites basaltiques de subsurface semblent valider la théorie reposant sur un système indépendant de la photosynthèse et lié à l'hydrogène. L'étude de l'aquifère metabasaltique de Mponeng (Afrique du Sud), situé à 2800 mètres de profondeur, a révélé la présence d'une communauté microbienne dominée par un phylotype appartenant aux *Firmicutes* présentant une séquence d'ARNr 16S similaire à 91% avec celle de *Desulfotomaculum kuznetsovii*, une BSR thermophile sporulante utilisant H₂ comme donneur d'électron. Le maintien de cette population serait permis grâce à la production abiotique de dihydrogène et de sulfates, et ce à des concentrations suffisantes pour supporter leur activité pendant des millions d'années sans apport de nutriments originaires de la surface (Lin et al., 2006).

Les eaux souterraines de la source hydrothermale de Lidy Hot (Idaho, USA) semblent, quant à elles, cautionner la prépondérance du domaine *Archaea* (>90%). Au sein de cette communauté archéenne, les méthanogènes autotrophes ont été principalement identifiés. De plus, la concentration en dihydrogène (13 nM) et la quantité de biomasse (2,8.10⁵ cellules.mL⁻¹) peuvent coïncider avec une méthanogénèse autotrophique active (Chapelle et al., 2002). Toutefois, des teneurs élevées en sulfates ont été relevées dans ces eaux, évoquant la possibilité de métabolismes sulfato-réducteurs.

1.3.1.2. Les aquifères sédimentaires

Les aquifères sédimentaires sont généralement considérés comme des environnements poreux où l'eau peut circuler à travers un réseau de pores interconnectés. Le diamètre et l'interconnectivité des pores contrôlent la distribution et l'activité microbienne en limitant la disponibilité en nutriments (Fredrickson et al., 1997; Krumholz, 2000). Toutefois, ces écosystèmes détritiques sont rarement stériles, certains microorganismes étant potentiellement capables d'adapter leur morphologie aux contraintes spatiales de l'environnement dans lequel ils évoluent, relativisant ainsi l'impact des faibles porosités sur la probabilité de détecter les sources d'énergie et de carbone nécessaires à leur croissance ainsi qu'à leur maintien (Miyoshi et al., 2005). Globalement, ces systèmes oligotrophiques (Krumholz et al., 1997; McMahon et Chapelle, 1991) présentent des taux d'activités microbiennes très faibles (Goldscheider et al., 2006; Pedersen, 2000).

L'aquifère sédimentaire de Coastal Plain en Caroline du sud (USA) a été l'un des premiers écosystèmes détritiques largement étudié. Il est formé d'une succession de sédiments d'origines marines, deltaïques et fluviaux âgés de 70 à 80 millions d'années (Crétacé inférieur). Contrairement aux eaux localisées dans la zone de recharge, les eaux souterraines, situées dans la partie inférieure de la plaine, se sont révélées anciennes, anoxiques et oligotrophiques (Chapelle et Lovley, 1990). L'étude des fluides circulant à 550 mètres de profondeur a montré la présence d'une communauté microbienne relativement dense ($<10^3$ à $6,3 \cdot 10^4$ cellules.mL⁻¹) (Hazen et al., 1991) et diversifiée regroupant un large panel de métabolismes microaérophiles et anaérobies lithotrophes (Francis et al., 1989; Fredrickson et al., 1989; Jones et al., 1989; Pedersen, 1993; Sinclair et Ghiorse, 1989).

Plus récemment, les travaux de Kimura et al. (2005) et de Basso et al., (2009) menés sur des aquifères profonds du Great Artesian Basin (-935,7 mètres, Australie) et du Rauracien (-830 mètres, Bassin Parisien, France), correspondant respectivement aux périodes du Trias et du Jurassique, ont montré la présence de communautés microbiennes hydrogénotrophes à dominante bactérienne. Ces résultats ont amené les auteurs à suggérer l'utilisation de l'H₂ comme principale source d'énergie, supposant l'existence de SLiME dans ces environnements de subsurface.

Certaines guildes métaboliques ont été fréquemment détectées dans les aquifères sédimentaires profonds. C'est notamment le cas des homoacétogènes et des BSR. Ces microorganismes semblent posséder des caractères indispensables à la vie ou survie en subsurface, comme des physiologies adaptées aux conditions physicochimiques de leur environnement d'origine,

un large spectre métabolique ou à l'inverse un métabolisme lithoautotrophe strict ou encore une capacité à former des spores, garantie de survie sur le long terme et dans des conditions redox variées (Basso et al., 2009; Detmers et al., 2001; Kimura et al., 2005; Krumholz et al., 1997). L'un des genres bactériens le plus largement distribué est le genre *Desulfotomaculum*, aussi bien rencontré dans des aquifères détritiques de subsurface en Europe (Basso et al., 2009; Dumas et al., 1988; Detmers et al., 2001; Sass et Cypionka, 2004) que dans le reste du monde (Colwell et al., 1997; Love et al., 1993).

S'il est avéré que les aquifères sont carencés en nutriments, ils semblent riches en accepteurs d'électrons. Dans les systèmes d'interface aquifère/aquitard, les réserves de carbone organique solide résident dans les aquitards. L'une des possibilités d'association des accepteurs et donneurs d'électrons, indispensable à l'activité microbienne, demeure dans le transport des accepteurs d'électron présents dans les aquifères vers les aquitards. Dans ce scénario, les réactions biogéochimiques se situent dans la partie aquitard de la zone d'interface et seraient contrôlées par des phénomènes de diffusion ou d'advection des fluides à travers les aquitards (Martini et al., 1996; McMahon et al., 1999). A l'inverse, les donneurs d'électrons dérivés des aquitards pourraient diffuser vers les aquifères adjacents. Les zones réactionnelles se situeraient ainsi sur le côté aquifère de l'interface (McMahon, 2001). Par conséquent, une fermentation dans les sédiments peu perméables riches en matières organiques couplée avec une respiration anaérobie de composés biologiques de faible poids moléculaire, tel que les acides gras volatiles, diffusés dans les couches plus perméables où des accepteurs d'électrons comme le sulfate sont disponibles constitueraient d'importants processus de maintien de la vie procaryotique dans les environnements sédimentaires de subsurface. La figure 8 illustre ce phénomène.

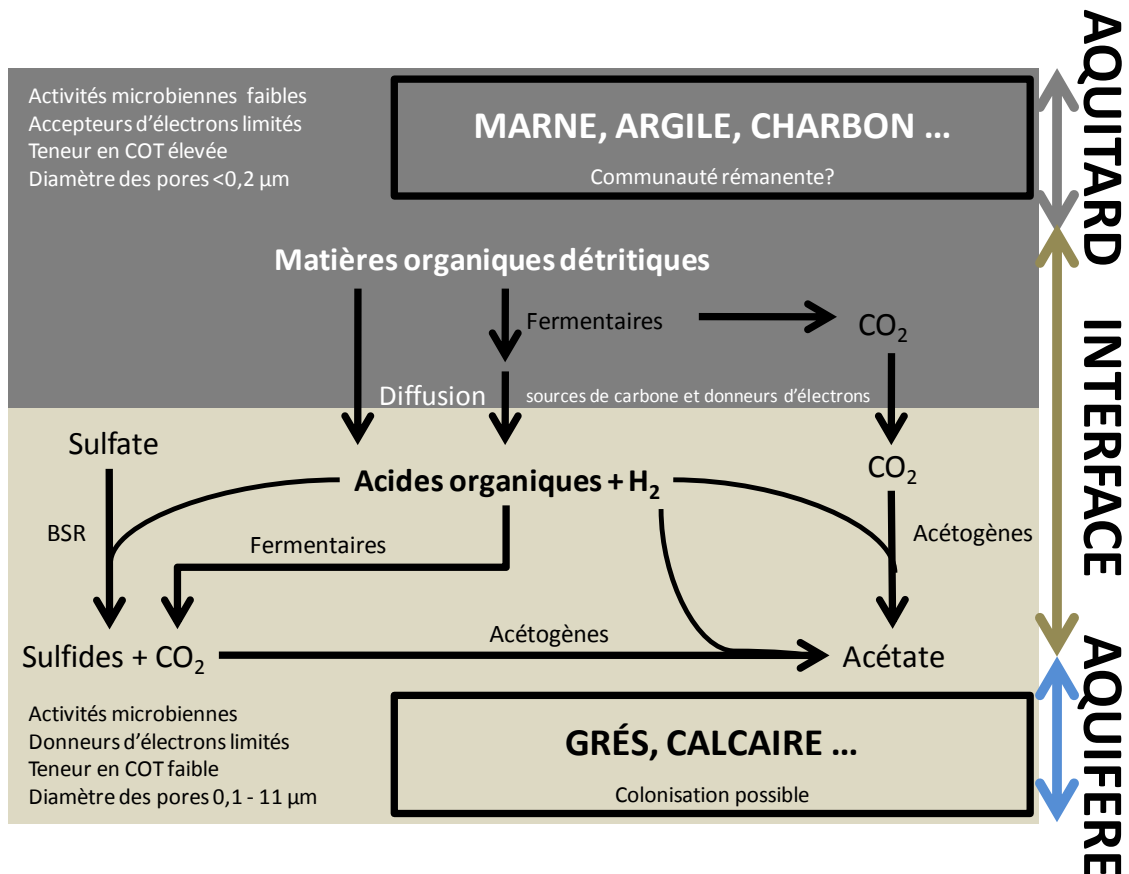
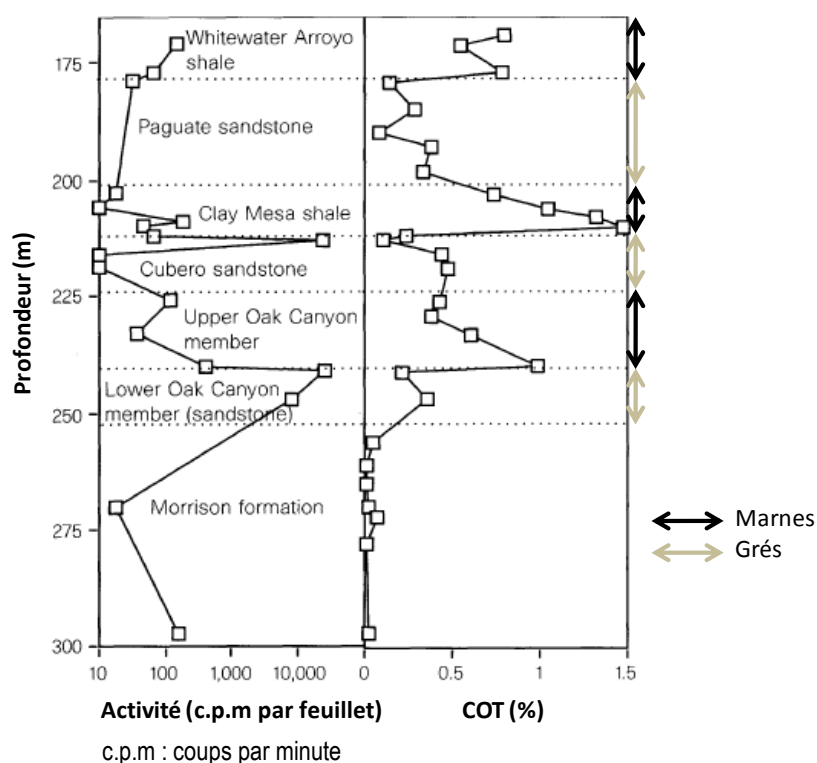


Figure 8. Représentation schématique des processus géomicrobiologiques dans la zone d'interface aquifère/aquitard (d'après Frederickson et Balkwill, 2006).

La découverte de bactéries fermentaires (Chapelle et Bradley, 1996) et d'importantes concentrations en matières organiques solides dans les aquitards suggèrent un flux de molécules organiques de faibles poids moléculaires et de « biogaz » (H_2 , CO_2 et CH_4) vers les aquifères où ces composés pourront être utilisés par une communauté, métaboliquement diverse, d'anaérobies hétérotrophes et autotrophes (McMahon, 2001). Différentes études ont montré l'importance de cette zone d'interface dans les réactions biogéochimiques incluant la réduction de l' O_2 , la dénitrification ou encore la réduction du fer ferreux, des sulfates et du CO_2 (méthanogénèse) (Detmers et al., 2001; Fry et al., 2009; Krumholz et al., 1997; McMahon, 2001; McMahon et al., 1999). A ce niveau, un parallèle entre les systèmes pétroliers et les interfaces sédimentaires aquifère/aquitard peut être mentionné. Les roches mère et de couverture pourraient être affiliées aux aquitards et les roches réservoirs aux aquifères. La principale différence entre les environnements pétroliers et le modèle d'interface sédimentaire résiderait dans les concentrations élevées en composés organiques contenus dans « l'aquifère » des systèmes pétroliers.

L'une des recherches les plus connues à ce sujet est celle réalisée par l'équipe de Krumholz (1997) sur une formation sédimentaire du Crétacé (90 – 93 millions d'années) localisée sur le site de Cerro Negro (Nouveau Mexique, USA). La colonne stratigraphique étudiée (de 175 à 300 m de profondeur) est constituée d'un empilement successif de marne (aquifard) et de grès riche en sulfates (aquifère) ne présentant pas d'événement géologique de transgression et de régression majeure. Au niveau de certaines interfaces marne/grès, d'importantes activités de sulfato-réduction ont été détectées et plus particulièrement, du côté gréseux. Aucune activité n'a été décelée dans les compartiments marneux ni dans les matrices des aquifères plus éloignées des interfaces. De plus, des teneurs en COT élevées ont été mesurées dans les marnes vicinales des interfaces de forte activité, comme le montre la figure 9.

Figure 9. Relation entre la profondeur, l'activité de sulfato-réduction et les teneurs en carbones organiques totaux (COT) sur le site du Cerro Negro (Krumholz et al., 1997).



La co-localisation des hauts niveaux d'activité et de COT suggère une diffusion de la matière organique séquestrée dans les marnes vers les grés créant des microniches favorables à la colonisation microbienne, et à son maintien sur des périodes géologiques, dans les compartiments gréseux situés aux interfaces. D'ailleurs, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ mesurées correspondent à une réduction biotique des sulfates. Par conséquent, les communautés microbiennes seraient plus abondantes dans les roches poreuses à proximité de l'interface aquifère/aquifard où la taille des pores est plus importante (jusqu'à 13 μm de diamètre) facilitant les échanges à travers les mouvements de fluide. Bien que l'activité de sulfato-réduction ait été identifiée comme le métabolisme dominant, l'existence de métabolismes

secondaires a été évoquée. L'isolement de deux nouvelles espèces bactériennes hydrogénotrophes, une BSR (*Desulfomicrobium hypogeium*) et une homoacétogène (*Acetobacterium psammolithicum*) a confirmé la présence d'une communauté procaryotique relativement diverse (Krumholz et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus de recherches conduites sur des échantillons naturels datés du Cénozoïque (96 à 124 mètres de profondeur) dans l'ouest de l'Allemagne (Detmer et al, 2001). Sur ce site, les zones d'interfaces sont constituées de sable et de lignite, roche sédimentaire composée de restes fossiles de plantes, et sont peuplées par une communauté bactérienne composée de BSR, de fermentaires et d'homoacétogènes. Ici encore, l'isolement d'homoacétogènes et de BSR, capables d'utiliser le dihydrogène comme source énergétique, prouve l'occurrence de ces processus microbiens dans les aquifères sédimentaires oligotrophiques de subsurface.

Malgré la découverte de communautés procaryotiques dans un grand nombre d'aquifères, certains systèmes semblent dépourvus de vie. L'étude de Colwell et al. (1997) mentionne cette éventualité. Au cours de leurs travaux réalisés sur des roches détritiques profondes (2091 à 2096 mètres de profondeur) de Piceance Basin (Colorado, USA), aucun microorganisme cultivable ni acides gras phospholipidique, biomarqueur membranaire de cellules vivantes, n'ont été détectés. Cette absence de vie pourrait être expliquée par l'exposition de ces compartiments géologiques profonds à des paléotempératures extrêmes (120 – 145°C) sur des temps de l'ordre de plusieurs millions d'années, provoquant une stérilisation du milieu. A l'heure actuelle, la présence d'eau souterraine ancienne, la température *in-situ* toujours importante (85°C) et les porosités réduites, limitant le transport cellulaire vers les formations inférieures, constitueraient les principales causes de la non recolonisation des profondeurs.

1.3.2. Les aquitards/aquicludes

Décrits dans les paragraphes précédents, les formations géologiques perméables contenant des quantités non négligeables d'eau sont communément désignées sous le terme d'aquifères. Par opposition, un aquitard et un aquiclude représentent des faciès géologiques respectivement peu et non perméables. D'un point de vue géologique, un aquiclude est une formation non transmissive imperméable à l'eau comme une strate d'argile ou un dépôt salé ancien. Dans cette partie, le terme « aquitard » regroupera à la fois les aquitards vrais et les aquicludes. Ces systèmes profonds pourraient potentiellement contenir des populations initialement présentes dans les environnements de dépôts et ayant survécu aux conditions d'enfouissement. Ainsi, les microorganismes rencontrés dans ces habitats

peu perméables seraient les descendants de procaryotes colonisateurs ancestraux (Boivin-Jahns et al., 1996; Fredrickson et Balkwill, 2006). Dans le cas de la séquestration bactérienne dans les aquitards, environnements à faible potentiel de circulation et à teneur en eau réduite, des fréquences de division cellulaire très faibles sont attendues, de l'ordre de 1 division tous les 10 ou 100 ans (Fredrickson et Onstott, 1996).

1.3.2.1. *Les aquitards cristallins*

Du fait de leur nature cristalline, les roches ignées et métamorphiques sont communément non poreuses, offrant de faibles volumes habitables. Toutefois l'analyse microbiologique de ces aquitards cristallins est essentielle de par la fraction significative qu'ils représentent sur Terre (supérieure à 90% du volume total).

Seules quelques données traitent de la microbiologie des aquitards cristallins. En 2005, Zhang et al. ont mené des recherches sur une série de roches métamorphiques extraites d'un forage à l'est de la ceinture orogénique¹⁰ de Dabie-Sulu à l'occasion du programme CCSD (Chinese Continental Scientific Drilling). La faible quantité de biomasse recueillie, comprise entre 10^3 à 10^4 cellules.g⁻¹ de roche, était cohérente, d'une part avec les faibles porosités et contenus en carbone organique et d'autre part, avec la présence de nombreuses inclusions fluides et gazeuses dans les échantillons. L'analyse phylogénétique des roches a montré une dominance du phylum des *Proteobacteria* dans cinq étages géologiques distincts (-529, -730, -1080, -1930 et -2026 mètres), avec une modification de la communauté en fonction de la profondeur. De plus, des croissances microbiennes ont été obtenues à partir de ces mêmes échantillons. Selon les auteurs, les microorganismes détectés par ces deux approches (moléculaire et culturale) seraient séquestrés au sein des roches, dans les inclusions qui les auraient protégées des différents phénomènes géologiques passés (subduction et autres). Les procaryotes détectés seraient, par conséquence, datés de la même période voire antérieures à celle des inclusions les contenant.

Des données similaires de biomasse ($<10^2$ à 10^3 cellules.g⁻¹ de roche) ont été obtenues à partir de quartzite (aquitard métamorphique) et de Carbon Leader (aquitard sédimentaire) prélevés à 3250 m de profondeur dans la mine d'or de Witwatersrand Basin (Afrique du Sud). Dans cette étude, malgré les précautions prises durant le forage et lors du conditionnement des échantillons, la présence potentielle de contaminants au cœur des échantillons n'a pu être écartée (Onstott et al., 2003).

¹⁰ Ceinture orogénique : Système montagneux allongé et étroit, installé en bordure d'un continent.

1.3.2.2. *Les aquitards sédimentaires*

Contrairement aux roches métamorphiques et ignées, les aquitards sédimentaires, comme les environnements pétroliers, apparaissent comme des réservoirs de subsurface riches en matière organique (Krumholz et al., 1997; McMahon, 2001). Toutefois, la texture du sédiment influence fortement la densité cellulaire. Des concentrations microbiennes plus faibles ainsi que des niveaux de diversité et d'activité moindres ont été constatés dans les encaissants argileux et les marnes (Chapelle, 1993; Krumholz et al., 1997). En plus de la faible porosité de ces faciès géologiques, des phénomènes de sorption fortes et irréversibles des composés organiques aux feuillets argileux (Gallori et al., 1994) pourraient limiter l'accès des microorganismes aux nutriments.

Une étude menée sur des sédiments argileux, âgés de 35 millions d'années, en provenance du laboratoire souterrain de Mol (Belgique) a mis en évidence une diminution drastique de la biomasse cultivable et de l'activité bactérienne en fonction de la profondeur des prélèvements par rapport à la paroi de la galerie (figure 10). Cependant, des extraits d'ADN ont été obtenus à partir des différents échantillons. L'analyse moléculaire a révélé la présence de bactéries jugées autochtones apparentées aux genres *Azoarcus*, *Rhodocyclus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Desulfotomaculum*, *Carnobacterium* et *Propionibacterium* et ce, bien qu'une putative contamination de certains échantillons ait pu survenir (Boivin-Jahns et al., 1996).

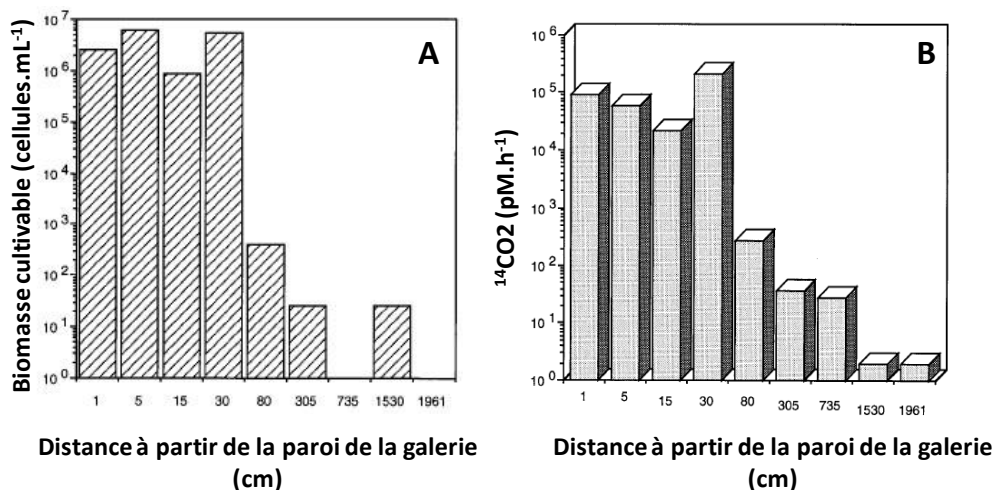


Figure 10. Biomasse cultivable et activité bactérienne dans les argiles de Mol en fonction de la profondeur de prélèvement par rapport à la paroi de la galerie du laboratoire souterrain (Boivin-Jahns et al., 1996). (A) Dénombrement des colonies observées sur milieux d'enrichissement correspondant aux bactéries viables et cultivables. Une diminution brutale de la biomasse cultivable est observée à partir de 80 cm. Au-delà de 3 mètres de profondeur, aucun microorganisme endogène n'a été mis en évidence. (B) Assimilation microbienne du [¹⁴C]-glucose. Les graphiques A et B présentent des profils similaires.

Une absence de cultivabilité associée à une récupération d'ADN bactérien a également été constatée dans des marnes noires récupérées à 338 cm sous la surface (Serre des Castets, France) (Inagaki et al., 2005). Une forte corrélation entre la fraction de *δ-Proteobacteria* contenue dans les échantillons et leur localisation par rapport à une strate définie comme l'un des événements anoxiques océaniques du milieu du Crétacé suggère que l'ADN environnemental extrait proviendrait d'un écosystème microbien océanique fossile. De plus, des sulfures de fer sous forme framboïdique, produits de l'activité microbienne de sulfato-réduction, ont aussi été détectés dans cette couche sédimentaire. Les auteurs ont alors évoqué la notion de « Paléome¹¹ », concept largement controversé de nos jours (Damsté et Coolen, 2006; Hoehler, 2005).

A l'inverse, certaines extractions d'ADN se sont révélées infructueuses à partir de systèmes sédimentaires confinés, et notamment concernant le faciès argileux du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute Marne (France) et l'argile à Opalinus au Mont Terri (Suisse). Néanmoins, les enrichissements positifs obtenus pour l'argile à Opalinus ont démontré la présence d'une communauté

¹¹ Paléome : concept dans lequel l'ADN environnemental extractible, originaire de microorganismes morts, préservés dans les roches au cours des temps géologiques est utilisé pour interpréter les événements passés (Inagaki et al., 2005).

bactérienne diversifiée dont certaines souches n'avaient encore jamais été caractérisées (Poulain et al., 2008).

1.3.3. *Les évaporites de subsurface*

Les évaporites sont des roches sédimentaires formées par précipitation d'ions en solution, dans un milieu aqueux sursaturé (saumure), soumis à une évaporation intense. La formation des évaporites est favorisée par un climat aride, mais pas nécessairement chaud, et un confinement du milieu afin de minimiser les apports en eau (météorique ou marine). Toutefois, les apports d'eau sont indispensables, car le système a besoin d'un apport d'ions constant. L'augmentation de la salinité induit une diminution de la teneur en oxygène et de la valeur de pH. Conjointement à ce phénomène, une diminution de la biodiversité a aussi été constatée (Oren, 1999; Oren, 2001).

La présence de microorganismes cultivables dans des formations évaporitiques âgées de plusieurs millions d'années a été prouvée à de nombreuses reprises. Des *Archaea* halophiles ont été fréquemment rencontrées et isolées de tels environnements (Grant, 2004; Grant et al., 1998; McGenity et al., 2000). Des communautés bactériennes halophiles (Vreeland et Huval, 1991; Vreeland et al., 2000) ou présentant un caractère versatile face à l'halo-tolérance (Norton et al., 1993) ont aussi été décrites. Dombrowski suggérait déjà en 1966 qu'une combinaison des phénomènes de salification et de déshydratation lors de la formation des dépôts salés pourrait permettre la conservation de cellules intactes. Ainsi, certains microorganismes, et notamment les Haloarchaea, pourraient rester viables au sein d'inclusions fluides sur des temps considérables, voire géologiques.

Dans la plupart des cas, une accumulation de matière organique coïncide avec la formation d'évaporite. Ces réservoirs de nutriments sont disponibles pour les microorganismes situés dans leurs environnements proches ou pour venir recharger les niches écologiques que sont les inclusions fluides lors de mouvements au sein de la roche (Grant et al., 1998; McGenity et al., 2000). Les mouvements des inclusions fluides dans des roches salées pourraient induire un regain de vitalité et de croissance des microorganismes endogènes des roches par une recharge des inclusions en nutriments et ainsi fourniraient un mécanisme de survie sur le long terme (à l'échelle géologique). Toutefois, la matière organique ne semble pas entièrement oxydée. Une accumulation d'acétate a été constatée dans les milieux hypersalés, laissant penser que les métabolismes liés à l'acétate, dont les méthanogènes acétoclastes, ne joueraient qu'un rôle mineur voire aucun dans ce type d'écosystème (Joye et al., 2009;

Ollivier et al., 1994). A ce jour, la plupart des méthanogènes isolés d'environnements salés étaient des *Archaea* méthylotrophes (Grant, 2004).

Face à ces conditions drastiques de salinité ainsi que pour survivre sur des temps géologiques, les procaryotes ont dû développer des stratégies pour rester viables ou encore opter pour différentes formes de survie. Certains microorganismes luttent contre les fortes teneurs en sels en synthétisant et/ou accumulant des molécules organiques de faible poids moléculaire (Ollivier et al., 1994; Oren, 1999). D'autres, et notamment les Haloarchaea, ont favorisé une accumulation de KCl afin d'obtenir une teneur intracellulaire équivalente à celle en NaCl présente dans l'environnement (Oren, 1999). Une concentration cytoplasmique élevée en K⁺ protège de la dégradation de l'ADN alors que la présence d'ions Cl⁻ induit, chez certains procaryotes, la formation d'endospores (Grant, 2004; Grant et al., 1998). Ces formes de survie cellulaires sont généralement miniaturisées (inférieures au micron) par rapport aux formes actives (Grant et al., 1998) et restent mal connues. Les microorganismes pourraient survivre dans les inclusions fluides des évaporites en maintenant un métabolisme actif avec des temps de génération longs (de l'ordre de 10 à 1000 ans) ou, à l'inverse, en adoptant un état de dormance (Grant et al., 1998). Des formes de survie apparentées aux spores (halocystes et thallus) ont aussi pu être observées (Grant et al., 1998; McGenity et al., 2000; Zvyagintseva et al., 1998). Les spores sont d'ailleurs de remarquables formes de préservation cellulaire. Ces dernières étant partiellement déshydratées et ne contenant pas d'oxygène, ces conditions particulières permettent de stabiliser les molécules d'ADN. Ces structures seraient capables de survivre dans un état de déshydratation avancée sur des périodes supérieures à 1000 ans (Grant, 2004).

Les dépôts salés anciens peuvent être considérés comme des réservoirs de microorganismes en mode de survie ou des environnements colonisés par des communautés microbiennes adaptées dont la croissance est entrecoupée de périodes de dormance. La mise en culture du contenu d'une inclusion fluide a permis à l'équipe de Vreeland (2000) d'isoler la souche 2-9-3 à partir d'un cristal de halite âgée de 250 millions d'années. L'analyse de la séquence complète du gène codant l'ARNr 16S de cette bactérie a montré une forte similarité (99%) avec celle de *Bacillus marismortui*. Le caractère endogène de la souche 2-9-3 avait été démontré par les différents contrôles qualité estimant le risque de contamination à moins de 1.10^{-9} . Cette étude, ainsi que celle réalisée par Fish et al. (2002), suggère que la croissance limitée des microorganismes séquestrés au sein des roches salées tend vers une diminution du taux de mutation, donc de l'évolution de leur génome et de leur phénotype, au cours des temps géologiques. Les environnements hypersalés seraient ainsi le siège d'une lente évolution génétique (Grant, 2004; McGenity et al., 2000; Ochman et al., 1999).

Plus récemment, la présence d'ADN procaryotique a été détectée par une approche moléculaire réalisée sur des cristaux de halite contenant de fortes densités d'inclusions primaires. Les inclusions primaires apparaissent pendant la formation de l'évaporite et donc leurs contenus reflèteraient l'environnement de dépôt. L'identification des séquences partielles d'ADN codant pour le gène de l'ARNr 16S a révélé la présence d'Haloarchaea dans les roches les plus « jeunes » datées de 11 à 16 millions d'années alors que les dépôts salés anciens (65 à 425 million d'années) contenaient des séquences affiliées au domaine *Bacteria* uniquement (Fish et al., 2002). L'échec de l'approche culturale réalisée à partir des mêmes échantillons ne permet pas d'affirmer l'existence d'une communauté microbienne viable et cultivable, les séquences retrouvées pourraient être la conséquence de l'amplification d'ADN rémanent originaire de microorganismes ayant vécu dans l'écosystème il y a des millions d'années. La séquestration de microorganismes viables ou morts ou encore de leur ADN libre serait ainsi possible dans les roches salées (Grant et al., 1998 ; McGenity et al., 2000 ; Pedersen, 2000 ; Fish et al., 2002 ; Grant, 2004).

Les environnements à hautes teneurs en sels permettraient aussi une meilleure conservation des biomolécules en réduisant significativement le taux de dépurination de l'ADN, en protégeant l'ARN de l'inactivation par la chaleur (Grant et al., 1998 ; Grant, 2004) ou encore en augmentant la tolérance des microorganismes et des biomolécules séquestrés dans les roches salées aux événements métamorphiques (Grant et al., 1998). Les hautes teneurs en sel protègent indubitablement les biomolécules mais la relation entre les fortes concentrations en sel et la conservation reste hypothétique.

1.4. Les limites de vie en subsurface

L'existence d'une biosphère profonde séquestrée dans les sédiments et dans la croûte terrestre est maintenant admise par le monde scientifique. Néanmoins, il paraît judicieux d'évaluer et de préciser les critères spécifiques des milieux de subsurface impactant directement sur la croissance et l'activité microbiennes. La présence de vie en profondeur dépend de différents paramètres physico-chimiques intimement liés. La viabilité d'un système pourra être jugée en fonction de plusieurs facteurs limitant principaux, entre autres la teneur en eau et la porosité, la température et la pression régnant *in-situ*, la salinité du milieu et la disponibilité en accepteurs et en donneurs d'électrons.

La présence d'eau liquide est un élément indispensable au développement et à la croissance microbienne. Les zones de colonisation se situent majoritairement aux interfaces eau-roche comme les aquifères, les failles et fissures, les inclusions ou encore les écoulements karstiques et hydrothermaux. Toutefois, le ratio liquide/solide dans les écosystèmes rocheux profonds est généralement peu élevé octroyant une place minime à la vie (Pedersen, 2000 ; Amend et Teske, 2005). Les microorganismes endogènes des environnements de subsurface sont donc contenus dans les pores des sédiments consolidés et des roches. Ces petits espaces limitent les mouvements et les activités microbiennes (Frederickson et al., 1997), la disponibilité en nutriments et ralentissent la croissance (Boivin-Jahns et al., 1996). De plus, les événements géologiques de compaction induisent une perte de connectivité des pores conduisant à une distribution spatiale hétérogène des microorganismes (Boivin-Jahns et al., 1996 ; McGenity et al., 2000) et une diminution du diamètre des pores. Fredrickson et Onstott (2001) ont supposé que la présence physique de procaryotes nécessitait une porosité supérieure à 0,2 μm . Néanmoins, des micro-organismes d'une taille inférieure à 0,2 μm ont été détectés après filtration d'eaux d'aquifères circulant dans des roches sédimentaires et granitiques (Miyoshi et al., 2005).

La température est le principal facteur limitant de la croissance microbienne. Comme la température augmente en moyenne de 2,5°C tous les 100 mètres de profondeur (exception faite de certains gradients géothermiques observés à l'échelle régionale), les températures *in-situ* régnant dans les environnements de subsurface peuvent atteindre, voire excéder les 150°C, limite théorique permettant la croissance microbienne (Stetter et al., 1993). A ce jour, la température de 121°C constitue la température maximale non stérilisante à laquelle un développement bactérien a pu être observé (Kashefi et Lovley, 2003; Takai et al., 2008). Cependant, l'hypothèse émise par Magot et al. (2000), dans le cas des écosystèmes pétroliers, suggère que le seuil de température favorable à la présence et à l'activité de microorganismes autochtones se situerait aux environs de 80/90°C, hypothèse également validée par de nombreuses observations antérieures (Barth, 1991; Bernard et al., 1992; Fisher, 1987; Grassia et al., 1996; Philippi, 1977; Stetter et al., 1993).

De nombreux microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont aussi piézophiles (Alain et al., 2002; Bale et al., 1997; Bernhardt et al., 1988; Marteinsson et al., 1997; Marteinsson et al., 1999; Takai et Horikoshi, 2000). Bien que l'effet de la pression soit secondaire face au paramètre température (Amend et Shock, 2001), les fortes pressions hydrostatiques présentes dans les écosystèmes de subsurface pourraient augmenter la tolérance des communautés procaryotiques endogènes aux hautes températures (Haight et Morita, 1962). Ce phénomène a été observé lors de la caractérisation de l'hyperthermophile *Thermococcus barophilus*, isolée d'une cheminée hydrothermale située à 3550

mètres de profondeur, devenant piézophile strict entre 95 et 100°C (Marteinsson et al., 1999). La pression aurait aussi un impact sur la physiologie et les métabolismes énergétiques des communautés microbiennes (Magot et al., 2000). Les taux de croissance des microorganismes qualifiés de piézophiles se révèlent plus performants sous hautes pressions que sous pressions faible ou atmosphérique (Kallmeyer et Boetius, 2004; Marteinsson et al., 1997). Les hautes pressions auraient également un effet bénéfique sur la conservation des communautés microbiennes de subsurface (Horikoshi, 1998; Marteinsson et al., 1997; Marteinsson et al., 1999). A l'heure actuelle, l'isolat *Pyrococcus* CH1, isolé du plus profond des fumeurs noirs (-4100 m), est le seul microorganisme hyperthermophile piézophile strict pour la totalité de sa gamme de croissance (Zeng et al., 2009). Le développement de cette *Archaea* hyperthermophile nécessite une pression minimale de 200 bars pour une température minimale de 80°C. Il semble donc que les températures et les pressions élevées constituent les paramètres physiques primordiaux des écosystèmes profonds. Toutefois à la différence de la température, aucune limite haute de la résistance à la pression n'a encore été fixée.

La teneur en sels peut aussi limiter l'activité microbienne. La salinité¹² des eaux de formation des environnements profonds varie de douce ou faiblement salée à des eaux saturées en sels. Même si de nombreux microorganismes ont été isolés de milieux hypersalés, il semblerait que les environnements anoxiques associant température élevée et forte salinité soient dépourvus de vie (figure 11). Dans les réservoirs pétroliers, la découverte de microorganismes hyperthermophiles capables de croître à une température supérieure à 100 °C a été expliquée comme une contamination provenant d'eaux d'injections. Il existerait donc une limite théorique (courbe bleue, figure 11), séparant les écosystèmes fertiles des milieux stériles, basée uniquement sur l'association des paramètres température et salinité. Cette hypothèse, extrapolée à l'ensemble des écosystèmes de subsurface, repose sur des études microbiologiques menées sur différentes eaux de gisements pétroliers.

¹² Même si en microbiologie, la salinité est fréquemment associée à la concentration en NaCl, il ne faut pas oublier que d'autres sels, tels que le CaCl₂, le MgSO₄ et bien d'autres, sont englobés sous ce terme.

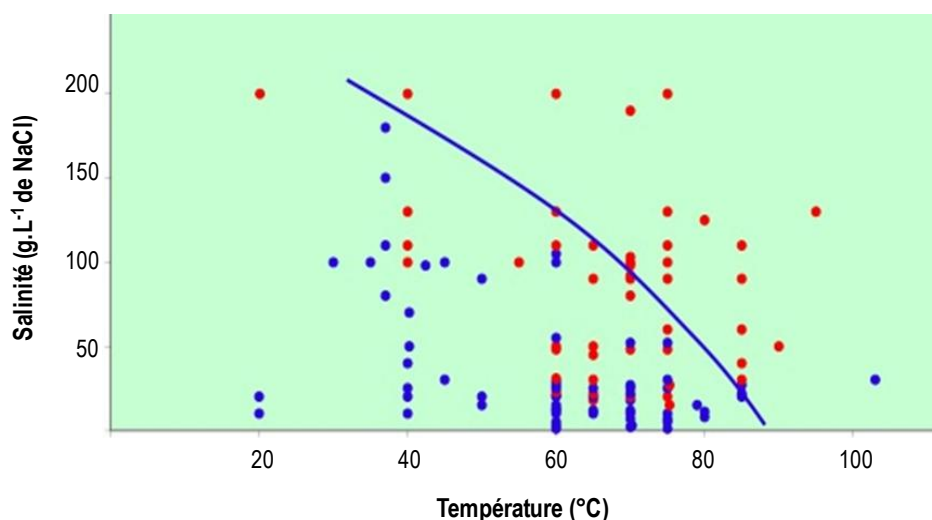


Figure 11. Détection de microorganismes cultivables dans les eaux de gisements pétroliers en fonction de deux paramètres *in-situ* : la température et la salinité. Les points bleus signalent la présence et les rouges l'absence de microorganismes dans le milieu étudié (source : Magot et Ollivier extrait d'Alazard et al., 2010).

Un phénomène semblable à celui précédemment décrit a pu être observé lors de travaux réalisés sur des évaporites. Ces roches hypersalées (calcite, gypse, halite...), relativement pauvres en oxygène (2 ppm à la saturation équivalent à 5,2 M de NaCl, comparé avec 7 ppm dans l'eau de mer), sont issues de l'évaporation de l'eau de mer. Les études microbiologiques de Dombrowski (1966) menées sur des dépôts de sels datant du paléozoïque ainsi que celle de Larsen (1981) n'ont pas permis de déceler la présence d'une vie microbienne. Dans le cas des évaporites du paléozoïque, les roches ont été soumises à des températures avoisinant les 160°C (Grant, 2004; Grant et al., 1998). En 2000, McGenity et al. ont ainsi supposé que les évaporites ayant subi un événement géologique, induisant une exposition à des températures supérieures à 80°C, pouvaient être considérées comme stériles. Il existe cependant peu de vrais contrôles négatifs dans l'étude de la vie ancestrale.

La population microbienne se répartit en fonction de différents gradients physico-chimiques qui lui sont les plus favorables. L'augmentation de l'un des paramètres précédemment cités tend à diminuer la biodiversité présente dans les écosystèmes profonds (Grant et al., 1998; Oren, 1999; Pedersen, 2000). Il en sera de même pour l'augmentation combinée de deux ou plusieurs de ces paramètres.

Il existe également d'autres facteurs pouvant limiter l'activité microbienne tels que le pH, les rayonnements induits par les radioéléments, les fortes teneurs en métaux de haute toxicité (arsenic, mercure,...) ou encore la disponibilité en donneurs et accepteurs d'électrons. Certains biais doivent être

pris en compte lors de l'évaluation de la viabilité d'un système. Par exemple, le pH des eaux de formation des gisements pétroliers, mesuré à pression atmosphérique, indique des valeurs comprises entre 5 et 8. En prenant en compte les gaz dissous, le pH *in-situ* est généralement estimé entre 3 et 7 (Magot et al., 2000). Dans le contexte géologique des environnements profonds, les valeurs du pH peuvent être fortement influencées par la dissolution des gaz sous l'effet des hautes pressions.

La croissance des communautés procaryotiques confinées dans les écosystèmes de subsurface nécessite des apports en source d'énergie. Dans le cas de la croûte océanique, certains éléments (P, S, Cu, Fe et éléments traces) sont disponibles à partir des basaltes et des fluides hydrothermaux. De plus, en partant de l'hypothèse où le carbone inorganique dissous dans le fluide circulant représente une source de carbone potentiellement assimilable par les microorganismes, la disponibilité en composés azotés constituerait le principal obstacle à la synthèse de biomasse (Edwards et al., 2005).

Dans la croûte continentale, la biodisponibilité en composés élémentaires dépend du milieu considéré (Pedersen, 2000). De manière générale, les environnements terrestres profonds sont oligotrophes et les teneurs en éléments N et P apparaissent souvent comme limitant le développement microbien (Magot, 2005). Concernant les aquifères, environnements carencés en nutriments, les acides humiques et fulviques, composants principaux du COD des eaux souterraines, peuvent être utilisés comme substrats par certaines guildes métaboliques telles que les bactéries ferri-réductrices (Lovley et al., 1996). Le carbone organique résiduel séquestré lors de la sédimentation représente aussi une source en nutriment (Krumholz et al., 1997), au même titre que l'hydrogène moléculaire et le CO₂ d'origine abiotique (Pedersen, 1997; Stevens et McKinley, 2000).

Les environnements pétroliers constituent les seuls systèmes profonds présentant des excès en substrats ainsi qu'une disponibilité en composés azotés (N₂, NH₄⁺, hétérocycles aromatiques). Dans les potentiels donneurs d'électrons, outre les géogaz, on peut citer le CO₂, l'H₂ d'origine biotique ou abiotique ainsi que de nombreuses molécules organiques simples telles que l'acétate, le butyrate ou le formate, ou plus complexes comme les acides naphéniques, les composés chimiques poly-aromatiques, les n-alcanes ou les sulfures polycycliques (Magot, 2005; Magot et al., 2000). Le sulfate représente l'accepteur d'électron le plus fréquemment rencontré dans les eaux de formation pétrolifère. Par conséquent, les environnements pétroliers semblent aptes à supporter une communauté procaryotique dense. De plus, la présence de microorganismes capables de dégrader les huiles en l'absence d'accepteurs d'électrons a été démontrée. Or les communautés microbiennes sont généralement comprises entre quelques cellules et 10⁴ cellules.mL⁻¹. La croissance bactérienne dans les systèmes pétroliers clos pourrait être inhibée par des facteurs limitants (théorie du « Biostat » ;

Sunde et Torsvik, 2005) comme des teneurs élevées en composés biostatiques toxiques, tels que les sous-produits des métabolismes microbiens, les métaux lourds et les hydrocarbures solubles, ou encore par une carence en phosphore par exemple, la disponibilité de cet élément étant très peu connue dans les écosystèmes pétroliers.

Le prélèvement des échantillons de subsurface constitue la première étape vers la caractérisation des écosystèmes souterrains. L'excavation de roche et la construction de puits ou de mines perturbent les écosystèmes profonds en créant des fissures, en modifiant les conditions physico-chimiques du milieu et en introduisant des micro-organismes allochtones. Ces données justifient la nécessité de mettre en place des protocoles d'échantillonnage (forages essentiellement) et des procédures de conditionnement adaptés dans le but de limiter la contamination, tout particulièrement lorsque les formations géologiques visées sont pauvres en biomasse.

2. L'échantillonnage des environnements de subsurface : méthodologies et contraintes

La contamination microbienne des échantillons naturels pendant les opérations de forage est indiscutable et doit être prise en considération lors de l'interprétation des résultats. Tout d'abord, la technique même de forage impacte sur la qualité des échantillons naturels récupérés. Une meilleure préservation de l'intégrité physique des carottes a été constatée lors d'opérations de forage utilisant un forage rotatif plutôt qu'un forage à percussion (Lehman et al., 1995). De plus, les faciès géologiques échantillonnés avec la technologie APC (Advanced Piston Coring) sont généralement moins contaminés que ceux obtenus par le procédé XCB (eXtended Core Barrel) beaucoup plus destructif comme le montre la figure 12 (Amend et Teske, 2005; D'Hondt et al., 2003; House et al., 2003). De ce fait, des études préalables de la lithologie et de la stratigraphie exactes des emplacements cibles sont des pré-requis et permettent d'adapter les procédés d'excavation aux roches qui seront rencontrées durant l'opération de forage (Phelps et al., 1989).

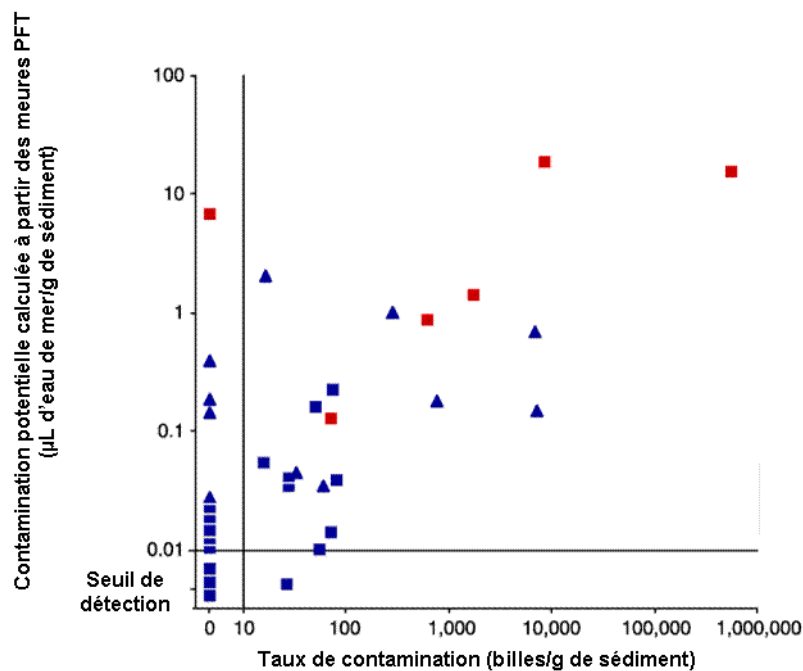


Figure 12. Comparaison de 34 résultats de tests de contamination par traceurs particuliers (microsphères) et chimiques (composés perfluorocarbonés ou PFT). Les échantillons forés à l'aide du procédé APC sont symbolisés par les carrés (bleu pour le centre et rouge pour la périphérie) alors que le cœur de ceux extraits par la technique XCB sont indiqués par des triangles bleus (d'après House et al., 2003).

Lors du carottage, diverses précautions peuvent être prises afin d'évaluer et de limiter l'intrusion de la contamination, provenant de l'extérieur mais également entre les différents faciès, pour focaliser les études microbiologiques ultérieures sur les zones non contaminées.

Un nettoyage et une stérilisation des équipements de forage sont préconisés (Sass et Cypionka, 2004) bien que ces procédures soient généralement irréalisables. Un système de fluide de forage en circuit fermé doit être mis en place sur site afin de minimiser leur contamination. De plus, les fluides de forage doivent contenir le moins de microorganismes possibles. La réalisation d'une telle asepsie est extrêmement coûteuse (Pedersen, 1993).

En se basant sur l'hypothèse que les microorganismes vont suivre le flux de fluides de forage, des traceurs peuvent être ajoutés aux boues de forage afin d'estimer la pénétration de la contamination. Le traceur idéal doit être chimiquement inerte, absent de l'environnement naturel étudié et facilement détectable à des concentrations extrêmement faibles. Les traceurs utilisés sont regroupés en différentes catégories :

- les traceurs particuliers tels que les microsphères fluorescentes dont les dimensions sont équivalentes à celles de microorganismes (0,2 à 1,3 μm) à une concentration de l'ordre de 1.10^3 sphères.mL⁻¹ (Amend et Teske, 2005; Inagaki et al., 2005; Mauclaire et al., 2007; Pedersen, 1993; Stroes-Gascoyne et al., 2007),
- les traceurs chimiques solubles comme les composés perfluorocarbonés, le bromure de potassium ou encore des colorants fluorescents (Amend et Teske, 2005; Phelps et al., 1989). Zhang et al. (2005) avaient utilisé comme traceurs des composés chimiques abondants dans les fluides de forage (chlorure et sulfate) et faiblement retrouvés dans les roches,
- les traceurs isotopiques comme le ¹³C naturellement présents dans les roches et les boues de forage, une comparaison de leurs teneurs respectives permettant une estimation approximative de la contamination (Zhang et al., 2005).

L'analyse d'échantillons de fluides de forage constitue une alternative pour déterminer le « fond » de populations microbiennes potentiellement introduites pendant le forage (Lehman et al., 1995; Pedersen, 1997; Zhang et al., 2005).

Dans le cas des études réalisées sur les fluides d'aquifères, un nettoyage intensif du puits d'accès préexistant est fortement recommandé avant tout prélèvement. En 2005, Basso et al. ont étudié les effets d'une procédure de nettoyage mécanique et de désinfection par chloration d'un puits d'échantillonnage sur la composition et l'abondance des populations microbiennes présentes dans des échantillons d'eau originaires de la formation calcaire du Rauracien (800 mètres de profondeur) à l'est de Paris. Une décroissance de la population bactérienne totale (figure 13) et une inversion des types trophiques dominants (hétérotrophes *versus* oligotrophes) ont été observées au cours de la procédure de nettoyage. Ces travaux démontrent que l'eau collectée après une simple purge (S2), sans l'élimination du biofilm qui s'est développé sur les parois internes du conduit, n'est pas représentative de l'eau collectée après nettoyages du puits (S4). Plusieurs groupes bactériens sont uniquement détectés après la procédure complète de nettoyage du puits et représentent des composantes importantes de l'écosystème souterrain.

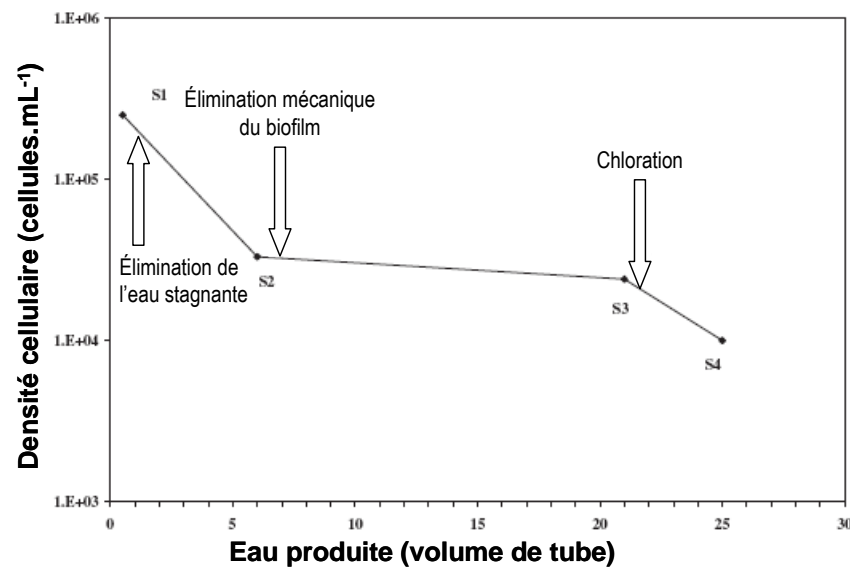


Figure 13. Dénombrement microbien réalisé sur des échantillons d'eau collectés aux différentes étapes d'une procédure de nettoyage (Basso et al., 2005).

Le matériel et les composés utilisés lors des opérations de forage et de prélèvements sont supposés répondre à différents critères comme l'absence de toxicité, la libération négligeable de substances organiques, notamment pour les fluides de forage, et une stérilité maximale garantissant le maintien et la représentativité à l'état initial des communautés endogènes peuplant les environnements profonds (Pedersen, 1993). D'ailleurs, les conditions de stockage mimant les conditions physico-chimiques *in-situ* (température, pression, anoxie, potentiel redox) assureraient probablement un meilleur maintien des communautés microbiennes à moyen et long terme.

La grande majorité des forages n'étant pas dédiée à des études de microbiologie, la prise en compte de ces difficultés dans les chantiers de forage reste anecdotique. S'il est vrai que certaines précautions peuvent être prises post-forage, telles que la décontamination des surfaces externes des échantillons suivie du sous-échantillonnage des zones internes découpées en conditions stériles au laboratoire (Colwell et al., 1997; Fry et al., 2009; Poulain et al., 2008; Zhang et al., 2005), la qualité du forage, notamment les mesures appliquées afin d'évaluer la contamination, permet de garantir l'intégrité microbiologique des échantillons.

3. La caractérisation microbiologique des environnements de subsurface

Les environnements de subsurface regroupent un ensemble de biotopes très disparates où la lithologie, l'histoire géologique et les paramètres physico-chimiques *in-situ* semblent impacter directement sur la colonisation et l'activité microbienne. Les résultats des différents travaux menés sur ces écosystèmes profonds convergent vers la détection de faibles concentrations en microorganismes et des niveaux d'activités métaboliques réduits, voire nuls. Dans ce type d'étude, la représentativité et la reproductibilité des résultats peuvent être difficiles à obtenir (Webster et al., 2003). En effet, les microorganismes séquestrés dans les compartiments géologiques s'organiseraient sous forme de « clusters » dans des niches écologiques favorables à leur développement provoquant une hétérogénéité spatiale (figure 14). Par conséquent, la caractérisation microbiologique des environnements de subsurface, et notamment à partir d'échantillons solides (roches, sédiments), constitue un challenge.

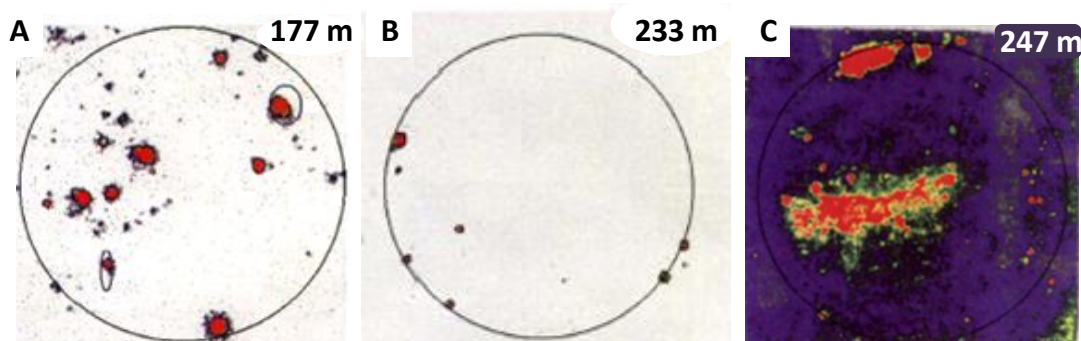


Figure 14. Images radio-isotopiques de l'activité de sulfato-réduction se déroulant à la surface de carottes de roche fraîchement prélevées (Krumholz et al., 1997). L'intérieur du cercle indique la zone de contact avec l'échantillon cylindrique. Le niveau d'activité est représenté par les couleurs (rouge > jaune > vert > bleu).

3.1. Approches microbiologiques classiques

Durant des décennies, la composition des communautés procaryotiques a été uniquement accessible par des observations microscopiques directes et des méthodes culturales. L'écologie microbienne basée sur une approche culturale a permis de détecter, d'isoler et de caractériser des bactéries viables à partir d'environnements profonds variés. Cependant, ces méthodes culturales

donnent une image biaisée de la diversité présente *in-situ*, beaucoup de microorganismes étant réfractaires à cette méthodologie (Amann et al., 1995; Biddle et al., 2005; Vartoukian et al., 2010). Selon Amann et al. (1995), seulement 0,001 à 15% des bactéries initialement détectées dans un environnement sont cultivables (tableau 2). C'est le phénomène de « great plate count anomaly ». En 2008, le cumul des résultats de plusieurs milieux d'enrichissement ciblant différents types trophiques a permis d'obtenir une fraction procaryotique cultivable estimée à 30% de la biomasse totale contenue dans l'eau d'un aquifère granitique profond (Pedersen et al., 2008). Cependant, il ne faut pas oublier que les bactéries ont des métabolismes versatiles et qu'un même microorganisme peut croître sur divers substrats.

Tableau 2. Cultivabilité déterminée comme le rapport des bactéries cultivables sur le nombre total de cellules déterminé par comptage direct des unités formant colonies (Amann et al., 1995).

Habitats	Cultivabilité (%)
Eau de mer	0,001 – 0,1
Eau douce	0,25
Lacs mésotrophiques	0,1 – 1
Eaux d'estuaires non polluées	0,1 – 3
Boues activées	1 – 15
Sédiments	0,25
Sols	0,3

Les principales raisons de cette « non cultivabilité » sont (Amann et al., 1995; Fredrickson et Onstott, 1996; Muyzer et Ramsing, 1995; Prescott et al., 1993; Vartoukian et al., 2010) :

- la non représentativité des milieux d'enrichissement synthétiques qui ne tiennent pas compte de la chimie des environnements naturels,
- la difficulté de reproduire en laboratoire les conditions environnementales *in-situ*,
- la disparition des interactions entre les membres d'un même consortium par les mécanismes de quorum sensing¹³ et autres molécules signaux ou encore à travers les relations hôte/symbionte,
- la sélection de bactéries faiblement représentées dans un environnement par un milieu de culture donné,
- le passage d'un état viable mais non cultivable de certaines bactéries hors de leur écosystème d'origine,

¹³ quorum sensing : mécanisme bactérien de communication

- les temps de génération (qui pourraient être très longs) des microorganismes endogènes des environnements profonds,
- la reprise d'un métabolisme actif, notamment concernant les microorganismes endogènes des environnements carencés de subsurface.

Par conséquent, la sélection imposée par les méthodes culturales entraîne une sous-estimation de la richesse et de l'abondance de la diversité microbienne (Vartoukian et al., 2010). Néanmoins, l'obtention d'isolats reste essentielle dans l'étude des réactions biogéochimiques se déroulant potentiellement *in-situ* (Biddle et al., 2005). Le faible nombre d'isolats originaires de la subsurface océanique et continentale profondes démontre la nécessité de développer de nouvelles stratégies culturales, notamment avec la mise en place d'incubateurs hautes pressions permettant de reproduire les contraintes de pression imposées *in-situ*, dans le but d'isoler de manière plus exhaustive la microflore endogène.

Les approches culturales à partir d'échantillons environnementaux sont fréquemment associées aux techniques d'observation par fluorescence (Basso et al., 2009; Fry et al., 2009; Reysenbach et al., 1998; Stevens et al., 1993; Zhang et al., 2005). L'utilisation de fluorophores tels que l'acridine orange, le DAPI ou encore le SYBR green et le SYTOX green, permet un dénombrement de la biomasse totale, composée de cellules mortes et vivantes, grâce à leur affinité avec les molécules d'ADN. Toutefois, une coloration aspécifique peut avoir lieu entre la matrice minérale et les molécules fluorescentes complexifiant la distinction entre les microorganismes séquestrés dans les roches et les petites particules minérales formant la roche (Klauth et al., 2004; Lunau et al., 2005). De plus, certains échantillons (roches et sédiments) présentent une autofluorescence trop importante ne permettant pas de les observer en fluorescence. Enfin, cette méthode n'apporte aucune information qualitative sur la diversité ni sur l'activité métabolique présentes dans l'écosystème. Néanmoins, la relative simplicité de cette technique et son coût relativement faible en font l'une des plus couramment utilisées en géomicrobiologie, la coloration restant un bon indicateur de la présence microbienne dans les systèmes de subsurface.

3.2. Approches cultures-indépendantes

Les observations directes par fluorescence d'échantillons naturels s'affranchissent des étapes de mise en culture. Cependant, la détection de cellules procaryotique par cette méthode nécessite la présence de populations microbiennes non négligeables et désolidarisées de leurs matrices environnementales. Des méthodes culture-indépendantes représentent des alternatives à la détection de communautés plus restreintes séquestrées dans les environnements consolidés.

Les méthodes biochimique et moléculaire sont basées sur la caractérisation des constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines, acides gras). L'analyse de la composition de ces molécules, directement extraites d'échantillons environnementaux, est utilisée pour détecter, caractériser et identifier la composition des communautés microbiennes présentes (Amann et al., 1995; Lehman et al., 1995; Malik et al., 2008; Marschner, 2007). Ces techniques « cultures-indépendantes » présentent comme avantage une meilleure sensibilité par rapport aux approches traditionnelles, offrant un accès direct à une fraction plus importante de la communauté microbienne contenue dans les matrices environnementales (Hugenholtz et al., 1998).

3.2.1. Composition en acide gras phospholipidiques (PLFA)

Les phospholipides à chaînes courtes (C10 – C20) sont des composants membranaires ubiquitaires de toutes les cellules bactériennes et représentent une part importante de la biomasse bactérienne. Ils sont, de plus, rapidement dégradés après la mort cellulaire (Malik et al., 2008). Les caractéristiques de ces molécules en font de bons indicateurs de la présence de microorganismes vivants ou morts récemment (Marschner, 2007). De ce fait, les profils de PLFA, extraits directement d'échantillons naturels, correspondent à l'abondance des différents groupes microbiens vivants composant une communauté. En condition de stress (limitation en nutriments, eau ou stress thermique), des variations dans la composition en PLFA ont également été constatées, suggérant une corrélation avec l'état physiologique des populations microbiennes. Néanmoins, cette relation, établie à partir de cultures en laboratoire, n'a jamais été vérifiée *in-situ* (Marschner, 2007). De plus, certains biomarqueurs lipidiques sont spécifiques de groupes microbiens, notamment des bactéries Gram-positives et négatives et des BSR (Green et Scow, 2000).

Dans le cas des études réalisées sur les environnements profonds, l'analyse de la composition en PFLA a généralement été utilisée dans le but d'évaluer la biomasse procaryotique totale (Colwell et al., 1997; Mauclaire et al., 2007; Onstott et al., 2003; Stroes-Gascoyne et al., 2007; Zhang et al., 2005).

Le facteur de conversion, généralement appliqué dans les écosystèmes de subsurface, est de l'ordre de 10^4 cellules bactériennes.pmol⁻¹ de PFLA (Green et Scow, 2000).

Malgré les informations que peuvent apporter l'étude de la composition en PFLA (biomasse procaryotique totale, composition globale de la communauté microbienne), les profils en acides gras ne fournissent aucune donnée sur la diversité de l'écosystème à une échelle plus fine (classe, genre, espèce). Le développement des techniques moléculaires basées sur l'étude de l'ADN a remédié à cette limitation en permettant la détection et l'identification de microorganismes directement à partir de l'environnement.

3.2.2. *Ecologie moléculaire*

L'avènement des outils moléculaires en écologie environnementale a permis d'améliorer considérablement nos connaissances sur la diversité microbienne présente dans divers écosystèmes, même les plus inhospitaliers. La mise en évidence de nombreuses séquences issues de clones environnementaux non affiliés à des séquences de microorganismes caractérisés (Amann et al., 1995) ainsi que la découverte du domaine *Archaea* (Woese, 1987; Woese et al., 1990) a révélé une biodiversité beaucoup plus vaste que celle initialement envisagée. Parmi les 61 phyla bactériens, seule la moitié possède un représentant cultivé (Hugenholtz et al., 2009). La puissance de l'outil moléculaire prend toute sa dimension dans le cas du domaine *Archaea* qui compte plus de 49 lignées identifiées mais seulement 54 espèces isolées à ce jour (réparties sur 18 lignées) (Auguet et al., 2010).

3.2.2.1. *Considérations générales*

L'ADN constitue le support de l'information génétique de toutes les cellules vivantes. Il est composé de séquences codantes, transcrites en ARN messagers puis traduites en protéines, et de séquences non codantes, soit non transcrites soit transcrites en ARN mais non traduites. Les molécules d'ARN ribosomiques (ARNr) entrent dans cette dernière catégorie. Ce sont des molécules indispensables à la synthèse protéique car constituants des ribosomes, présentes dans toutes les cellules biologiques. De par leur importance fonctionnelle au sein des cellules, les séquences nucléotidiques codant pour les différents ARNr ont été fortement conservées au cours de l'évolution. C'est en raison de cette stabilité que ces molécules ont été choisies comme marqueurs de référence

pour déterminer les relations phylogéniques entre les organismes. Le monde du vivant a alors été réparti en trois domaines : *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* (Woese et Fox, 1977) (figure 15).

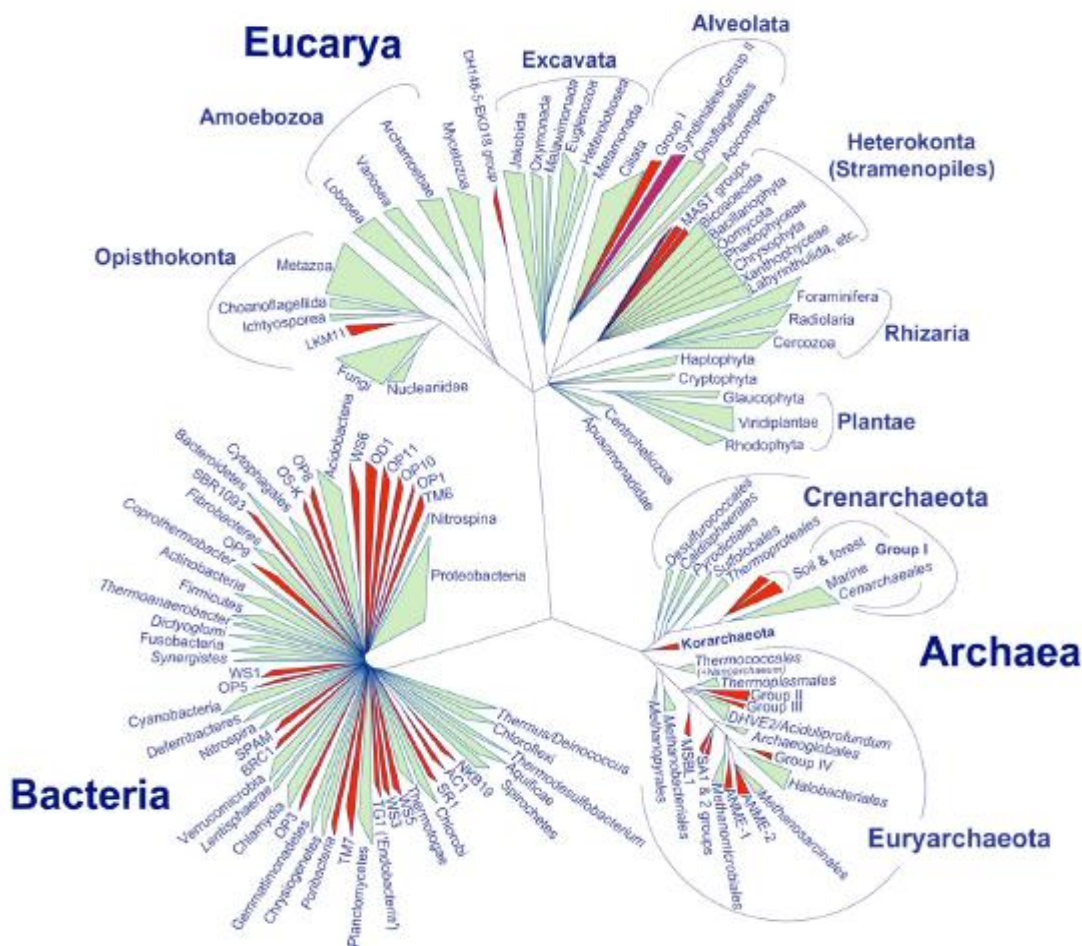


Figure 15. Représentation schématique de l'arbre de la vie basée sur l'analyse des séquences de la petite sous unité des ARNr (López-García et Moreira, 2008). Les triangles rouges indiquent les phylotypes et les lignées sans représentants cultivés.

3.2.2.2. Les marqueurs moléculaires : concepts et applications

Les procaryotes possèdent trois molécules d'ARNr, (l'ARN 5S, l'ARN 16S et l'ARN 23S) formant les deux sous unités ribosomales, codées par l'opéron *rrn*. Les études de diversité microbienne ont été principalement réalisées grâce à l'analyse comparative des séquences codant pour l'ARNr 16S (ARN de la petite sous unité du ribosome). En effet, l'ARNr 16S possède certaines propriétés requises pour en faire un marqueur phylogénétique fiable et pertinent (Woese et Fox, 1977):

- ces molécules sont présentes dans tous les organismes procaryotiques,
- elles sont abondantes dans l'unité cellulaire,

- elles tiennent un rôle essentiel dans la cellule, à la base de l'expression génétique,
- leur séquence nucléotidique possède des régions hautement conservées et des régions variables permettant d'évaluer les degrés de parenté entre différents microorganismes (figure 16)
- et la longueur de leur séquence nucléotidique est suffisante pour les outils moléculaires.

Aujourd'hui, le gène codant l'ARNr 16S représente le marqueur phylogénétique le mieux renseigné dans les bases de données de séquences nucléotidiques et, *de facto*, le plus employé. En 2010, plus de 1400000 séquences de ce gène étaient disponibles dans la base RDP II (elle en comptait moins de 700000 en 2008). L'établissement de banques de données permet l'identification de microorganismes et la caractérisation microbiologique d'écosystèmes, par l'affiliation des séquences codants l'ARNr 16S extraites de l'environnement à celles de microorganismes cultivés et le positionnement des microorganismes dans un arbre phylogénétique. Le fondement de la classification des procaryotes, ou encore taxonomie microbienne, est l'espèce. Néanmoins, aucune définition claire et universelle des différents rangs taxonomiques n'existe malgré leur réévaluation à l'aide de l'outil moléculaire (Oren, 2004; Scoble, 2004). Celles qui prévalent aujourd'hui, au niveau de l'espèce, sont :

- un pourcentage d'homologie d'hybridation ADN-ADN supérieur ou égal à 70% présentant une différence de température de fusion des hybrides (ΔT_m) inférieure à 5°C (Oren, 2004),
- une différence du taux de G+C inférieure à 5% (inférieure à 10% pour un même genre) et,
- un pourcentage d'homologie de séquences d'ARNr 16S supérieur à 97% pour Wayne et al. (1991) ou à 99% pour Oren (2004).

Même si les frontières entre les rangs taxonomiques ne sont pas toujours parfaitement définies, la taxonomie demeure une science indispensable dans le domaine de la microbiologie et plus particulièrement en géomicrobiologie où elle permet d'initier la réflexion sur l'évolution des microorganismes.

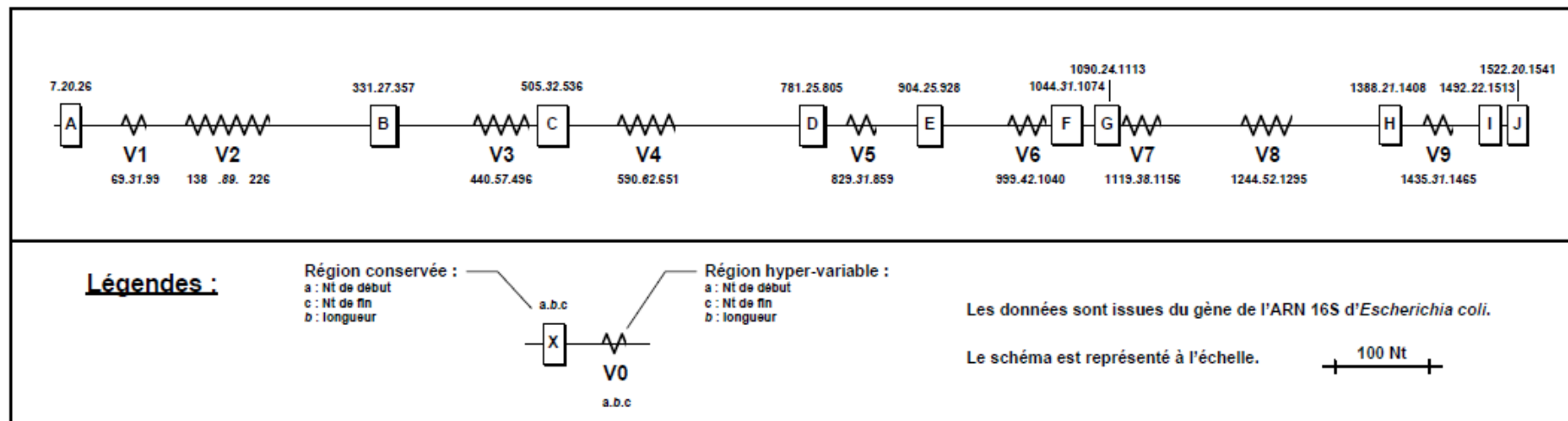


Figure 16. Représentation schématique de la distribution des régions conservées (A à J) et hypervariables (V1 à V9) du gène de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*.

La phylogénie moléculaire a souvent été associée au concept d'horloge moléculaire (Zuckerlandl, 1987; Zuckerlandl et Pauling, 1965), le génome d'un organisme semblant enregistrer toute son histoire évolutive. Si l'on considère que les mutations sont homogènes au cours du temps et dans l'ensemble du règne procaryotique, l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S permet d'établir des relations évolutives entre les espèces avec définition d'un rythme de mutation et datation des périodes de séparation entre les diverses lignées (Woese et Fox, 1977). Toutefois, des variations de taux de mutations ont été démontrées au sein d'une même espèce au cours du temps ainsi qu'entre différentes espèces pendant une même période (Gillooly et al., 2005). De plus, le choix de l'ARNr 16S comme marqueur de l'évolution implique en théorie que cette molécule ne doit pas être affectée par les mécanismes de transferts latéraux de gènes (López-García et Moreira, 2008). Or l'existence de tels phénomènes a été observé chez différentes espèces bactériennes incluant des fragments de longueur variables et des événements intra- et inter-espèces (Lan et Reeves, 1998; Parker, 2001; Schouls et al., 2003). Néanmoins, le gène codant l'ARNr 16S reste le marqueur le plus utilisé en écologie microbienne.

Bien que l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 16S permette d'identifier les espèces présentes dans une communauté microbienne d'un environnement, son principal inconvénient réside dans l'absence de lien direct avec leurs capacités métaboliques. Des prédictions peuvent être établies si les séquences détectées sont fortement apparentées à des espèces cultivées et caractérisées. Néanmoins, l'étude d'espèces bactériennes présentant des physiologies distinctes ont montré des similarités de séquences d'ARNr 16S supérieures à 99% (Fox et al., 1992) démontrant que les caractéristiques physiologiques et fonctionnelles d'espèces détectées dans un biotope *via* leur séquences d'ARNr 16S demeurent incertaines. L'étude de gènes de fonction codant pour des enzymes spécifiques constitue une approche alternative pour détecter et identifier, à partir de séquences environnementales, les communautés microbiennes impliquées dans des métabolismes cibles. Dans les environnements de subsurface, les gènes de fonction les plus fréquemment rencontrés sont ceux impliqués dans la sulfato-réduction, tels que *dsrAB* et *apsA* codant respectivement pour la bisulfite réductase et l'APS réductase, et la méthanogénèse avec le gène *mcrA* codant pour la méthyl coenzyme-M reductase (Moser et al., 2005; Von Der Weid et al., 2008). A certaines occasions, la recherche de ces gènes de fonction à partir d'extraits d'ADN environnementaux a permis de détecter la présence de microorganismes spécifiques, absents lors de l'analyse de la communauté *via* le gène codant pour l'ARNr 16S (Fry et al., 2009; Von Der Weid et al., 2008). Néanmoins, bien que la méthanogénèse et la réduction des sulfates ne soient plus à prouver dans les sédiments marins profonds, les procaryotes responsables y restent difficilement détectables. Ces constatations laissent

sous-entendre que ces populations seraient soit restreintes au sein de ces biotopes, soit supportées par une communauté encore inconnue dont les gènes de fonction seraient trop divergents de ceux connus à ce jour pour être détectés.

Ainsi deux approches moléculaires (phylogénique et fonctionnelle), utilisées individuellement ou combinées, sont potentiellement réalisables pour analyser et caractériser la diversité des communautés microbiennes autochtones des environnements de subsurface. Mais avant même d'envisager l'application de telles méthodes, la récupération d'ADN génomique environnemental est un pré-requis. Cette étape préalable, critique et déterminante pour la suite de l'analyse moléculaire, consiste à extraire, à partir d'échantillons naturels, de l'ADN de bonne qualité et représentatif de la communauté procaryotique endogène.

3.2.2.3. *Extraction d'ADN*

Les méthodes d'extraction d'ADN à partir d'échantillons naturels peuvent être divisées en deux groupes: les extractions indirectes et directes. Les extractions indirectes consistent à séparer la fraction microbienne de la matrice environnementale avant l'étape de lyse cellulaire et la récupération de l'ADN. Cette procédure aboutit généralement à l'obtention de faibles quantités d'ADN et à une représentation biaisée de la communauté car seules les bactéries facilement désorbables durant l'étape de dispersion sont accessibles (Roh et al., 2006; Tien et al., 1999). Elle demande, de plus, énormément de temps. Pour les extractions directes, la lyse cellulaire est réalisée directement en présence de roches, sols, sédiments, etc. Les rendements d'extraction directe sont généralement supérieurs à ceux obtenus avec la première méthode (Boivin-Jahns et al., 1996; Herrera et Cockell, 2007; Roh et al., 2006; Tien et al., 1999). De nos jours, l'extraction directe d'ADN est la plus utilisée.

Un grand nombre de méthodes directes ont été publiées concernant l'optimisation des extractions ou la comparaison des rendements d'extraction à partir de divers échantillons naturels comme les sols de surface, des environnements pollués, les boues activées, les sédiments, les parois de grottes ou encore les microbialites¹⁴ (Barton et al., 2006; Miller et al., 1999; Roh et al., 2006; Tsai et Olson, 1991; Wade et Garcia-Pichel, 2003; Yeates et al., 1998). La plupart des méthodes décrites combinent plusieurs procédures de lyse cellulaire qui peuvent être mécaniques, physiques ou enzymatiques. L'étape de lyse représente l'une des étapes clés de l'extraction. En effet, une destruction

¹⁴ Microbialite : sédiments formés dans les lits des lacs à partir des restes de communautés benthiques (algues et cyanobactéries).

préférentielle ou insuffisante des cellules microbiennes peut avoir lieu, entraînant une représentation erronée de la diversité procaryotique contenue dans un écosystème. A l'inverse, si les conditions de lyse sont trop rigoureuses, les molécules d'ADN, libérées dans le milieu réactionnel, peuvent être fragmentées, favorisant la formation d'artefacts lors de l'étape d'amplification (Wintzingerode et al., 1997). En plus des méthodes d'extraction conventionnelles, un grand nombre de kits commerciaux a été développé afin d'optimiser les rendements d'extraction et d'améliorer la reproductibilité des résultats. L'utilisation de kit permet également un important gain de temps (Herrera et Cockell, 2007; Roh et al., 2006).

L'efficacité des extractions directes peut être limitée par un certain nombre de facteurs environnementaux incluant les caractéristiques chimiques et physiques des écosystèmes étudiés. Certains composants peuvent adsorber les molécules d'ADN à leur surface (argiles, roche riche en calcium) alors que d'autres, co-extraits avec l'ADN, peuvent altérer la qualité des extraits (substances humiques, métaux) (Barton et al., 2006; Yeates et al., 1998). Les substances co-extraites peuvent être éliminées par purification sur colonne ou par dialyse (Arbeli et Fuentes, 2007; Barton et al., 2006; Tien et al., 1999; Zhou et al., 1996). Toutefois, ces étapes complémentaires de purification peuvent être la cause d'une diminution de la concentration en ADN. Cette perte d'ADN peut se révéler particulièrement néfaste pour les recherches menées sur les environnements contenant de faibles densités cellulaires comme le sont les écosystèmes de subsurface. Afin de limiter les phénomènes d'adsorption, l'ajout de différents composés présentant les mêmes affinités que l'ADN, avant l'étape de lyse, ont été proposés (ARN, Poly dIdC, lait écrémé) dans le but de masquer les potentiels sites d'adsorption (Barton et al., 2006; Frostegard et al., 1999; Volossiuk et al., 1995). Dans d'autres cas, les cellules microbiennes sont séquestrées au sein de la matrice environnementale et donc inaccessibles. C'est notamment le cas dans les écosystèmes sédimentaires consolidés (roches) et les biotopes volcaniques. La pulvérisation de roches en condition stérile offre un accès à la communauté procaryotique séquestrée quelle que soit la nature de la roche étudiée (Barton et al., 2006; Wade et Garcia-Pichel, 2003). Une seconde approche, proposée par Wade et Garcia-Pichel (2003), consistant à dissoudre la matrice environnementale dans un tampon légèrement acide (pH 5) contenant un chélateur (EDTA) s'est révélée efficace sur les roches calcaires et prometteuse pour les gypses. Une dégradation de l'ADN environnemental peut également survenir lors de procédures d'extraction directes en présence d'échantillons acides. En effet, les conditions acides induisent une dépurination des molécules d'ADN provoquant leur instabilité. De plus, les conditions acides favorisent les phénomènes d'adsorption de l'ADN, notamment sur les argiles (Herrera et Cockell, 2007).

Le choix du protocole d'extraction d'ADN est donc essentiel pour la caractérisation des communautés procaryotiques. Les biais étant propres à chaque procédure d'extraction, différentes empreintes de diversité peuvent être obtenues à partir d'un même échantillon (Martin-Laurent et al., 2001). De plus, le rendement d'extraction ne constitue pas le seul critère de choix. La qualité des extraits d'ADN représente aussi un paramètre important. Par conséquent, l'obtention de produit d'amplification à partir d'extraits d'ADN non visualisables sur gel ne justifie pas le rejet de la procédure d'extraction. Au contraire, dans certains cas, la détection d'amplicons satisfait au critère de sélection (Herrera et Cockell, 2007; Ning et al., 2009; Roh et al., 2006). Il est donc important de comparer les méthodes afin de sélectionner celle qui sera la plus adaptée aux environnements traités et d'appliquer la même technique lors d'un suivi de communauté.

3.2.2.4. *Les outils moléculaires*

L'ensemble des techniques moléculaires présente des inconvénients et des limites, par conséquent, le choix des outils utilisés devra être motivé par les objectifs des diverses études. Les outils moléculaires disponibles peuvent être divisés en deux catégories selon s'ils sont couplés ou non à l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des extraits d'ADN environnementaux.

3.2.2.4.1. *Les outils moléculaires « directs »*

Les méthodes PCR-indépendantes réunissent diverses techniques de marquage des acides nucléiques grâce à l'utilisation de sondes d'hybridation (amorces oligonucléotidiques) marquées (fluorescentes, radioactives) telles que les techniques de « blot », RSGP (Reverse sample genome probing), FISH (Fluorescent in situ hybridization) et les puces à ADN. Ces techniques sont pratiques pour déterminer la présence de groupes phylogénétiques et métaboliques précis mais sont restreintes par le nombre de sondes disponibles dans la littérature (Malik et al., 2008). Prenons comme exemple la technique FISH qui permet de s'affranchir à la fois des étapes de PCR et d'extraction de l'ARN en ciblant directement les ARNr présents dans les cellules. Bien que cette technique ait permis de décrire qualitativement et quantitativement les populations procaryotiques issues de divers biotopes (Anton et al., 2000; Barbieri et al., 2000; Glockner et al., 1999; Morozova et al., 2010), elle ne semble pas adaptée aux écosystèmes de subsurface consolidés et non perturbés. En effet, ces environnements contiennent généralement de faibles densités cellulaires suggérant la présence de cellules quiescentes ou faiblement actives ainsi que de cellules mortes, incompatibles avec l'utilisation actuelle de cette

technique (Madsen, 2000). Le problème d'autofluorescence des minéraux limite également l'utilisation de la technique FISH sur les échantillons de roches. Il en va de même pour les autres méthodes PCR-indépendantes.

3.2.2.4.2. Les outils moléculaires « PCR-dépendants »

A l'heure actuelle, les outils moléculaires dépendants de l'étape de PCR sont plus pertinents pour caractériser des écosystèmes profonds d'un point de vue microbiologique. L'amplification de fragments de gènes cibles par PCR démultiplie artificiellement le nombre de séquences initialement présentes, augmentant ainsi la sensibilité de détection tout en garantissant une haute fidélité des amplicons néo-synthétisés. De ce fait, l'augmentation de la quantité en fragments de gène d'intérêt autorise l'étude et la caractérisation microbiologique de biotopes pauvres en biomasse, incluant les environnements de subsurface.

Toutefois, la PCR présente différentes limitations et inconvénients. Des variations dans l'efficacité des réactions PCR ont été observées lors de l'amplification d'extraits d'ADN faiblement concentrés (Webster et al., 2003; Wintzingerode et al., 1997). L'efficacité des amplifications PCR ne sont pas identiques pour toutes les séquences nucléotidiques ciblées. En effet, des amplifications préférentielles ont été constatées notamment pour les séquences du gène codant l'ARNr 16S contenant de faibles pourcentages en bases GC. L'addition de DMSO permet une meilleure dissociation des brins d'ADN lors de la dénaturation et peut ainsi optimiser les PCR sur matrices ADN à taux GC compris entre 50 et 66% (Wintzingerode et al., 1997). De manière générale, les séquences les plus nombreuses auront tendance à être amplifiées en priorité. Par conséquent, comme le génome des *Archaea* contient un nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S inférieur à celui des génomes bactériens, un biais dans la représentativité des *Archaea* peut être généré à l'issue des réactions PCR (Pedersen et al., 1996). La représentativité de la communauté microbienne amplifiée par PCR peut aussi être biaisée par les conditions d'amplification appliquées (température d'hybridation, nombre de cycle, concentration en $MgCl_2$) et la spécificité des couples d'amorces utilisés (Ranjard et al., 2000; Wintzingerode et al., 1997). Les réactions PCR peuvent également induire la formation de molécules chimères par l'appariement de deux brins d'ADN distincts et homologues lors des premiers cycles PCR et favorisées par l'amplification d'ADN fragmentés (voir p. 76 paragraphe 3.2.2.3.). Une augmentation des temps d'élongation des cycles PCR diminue la formation de ces molécules chimériques (Wintzingerode et al., 1997).

De plus, les rendements d'amplification sont directement dépendants de la qualité des extraits d'ADN environnementaux. L'activité de l'ADN polymérase peut être fortement inhibée par les contaminants co-extraits avec l'ADN (Gonzalez et al., 2005; Malik et al., 2008; Wintzingerode et al., 1997). L'ajout d'additifs, tels que la BSA (bovin serum albumin), peut réduire les effets inhibiteurs des contaminants. Néanmoins, toutes les enzymes ne présentent pas la même sensibilité face à ces composés (Wintzingerode et al., 1997). L'ADN polymérase Φ 29 originaire d'un phage de *Bacillus subtilis* s'est révélée plus tolérante à ces inhibitions que les ADN polymérases standards (Gonzalez et al., 2005). Cette enzyme est notamment utilisée dans la méthode MDA (Multiple Displacement Amplification) car elle possède une processivité élevée. Cette méthode consiste à amplifier entièrement le génome par déplacement progressif des réactions d'amplification le long des brins d'ADN en condition isotherme en utilisant des amorces hexamériques aléatoires. L'approche MDA, considérée comme une pré-amplification aspécifique, permet de s'affranchir des phénomènes d'inhibitions lors de réactions PCR standard ciblant un marqueur moléculaire spécifique, par l'enrichissement en ADN des extraits environnementaux (Abulencia et al., 2006; Gonzalez et al., 2005). Malgré la puissance de cette technologie, la technique MDA reste difficile à mettre en place (conditions de stérilité rigoureuses) et demeure une procédure très onéreuse. De plus, la technique MDA possède certains biais incluant notamment une grande sensibilité à l'introduction d'ADN contaminant et une représentation erronée de la composition d'une population microbienne par l'amplification préférentielle de certains génomes (Abulencia et al., 2006; Binga et al., 2008). La démarche la plus fréquemment utilisée pour amplifier des extraits d'ADN faiblement concentrés, tels que l'ADN extrait d'environnements profonds, consiste à réaliser une PCR nichée (Fish et al., 2002; Gérard et al., 2009; Webster et al., 2003). Comme pour la technique MDA, cette approche, basée sur l'amplification d'une séquence cible située à l'intérieur de produits PCR, introduit un possible biais de représentation dû aux amplifications préférentielles. Cependant, l'application de deux réactions d'amplification successives, augmente la sensibilité et la spécificité des réactions PCR.

Malgré l'existence de biais pouvant fausser la représentativité et la composition des populations procaryotiques, l'amplification par PCR d'extraits d'ADN environnementaux demeure une étape incontournable et indispensable dans l'étude et la caractérisation microbiologique des environnements de subsurface. Les réactions PCR permettent la production de séquences d'intérêt en concentrations suffisantes pour la construction de banques de clones à partir de faibles quantités d'échantillons naturels. Si on considère un écosystème profond contenant 10^4 bactéries.g⁻¹ de sédiments et que l'on suppose qu'une cellule contient en moyenne 4,5 fg d'ADN, il faudrait extraire l'ADN de 11 à 88 kg de

matrices environnementale pour obtenir la quantité ADN nécessaire à la réalisation d'un clonage (de 500 ng à 4 µg) (Abulencia et al., 2006).

Les banques de clones

Encore fréquemment utilisées en géomicrobiologie, les techniques de clonage et de séquençage sont très utiles pour caractériser la diversité des environnements profonds (Cowen et al., 2003; Fry et al., 2009; Gérard et al., 2009; Kimura et al., 2005; Li et al., 2007; Von Der Weid et al., 2008). Cette approche nécessite, dans un premier temps, le clonage des produits PCR et, dans un second temps, le séquençage aléatoire de la banque de clones résultant de la première étape ; chaque colonie isolée constitue un clone possédant un seul et unique insert du fragment de gène d'intérêt. Une présélection des clones peut être réalisée afin de (i) vérifier la longueur correcte de la séquence insérée et (ii) d'éliminer les clones possédant une séquence redondante. La comparaison des séquences clonées à celles disponibles dans les banques de séquences telle que Genbank permet d'identifier la diversité microbienne contenue dans l'environnement. La construction d'arbre phylogénétique constitue la représentation visuelle la plus efficace pour établir les relations de parenté entre des séquences environnementales et des microorganismes caractérisés. L'établissement de courbe de raréfaction est l'un des moyens permettant d'évaluer la richesse et la représentativité de la diversité mise en évidence par PCR (Colwell et al., 2004; Li et al., 2007). Néanmoins, l'analyse de communautés complexes peut s'avérer longue et coûteuse par cette technique (Muyzer et Smalla, 1998).

Les techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes moléculaires permettent d'obtenir une image de la diversité ainsi qu'une représentation de l'abondance relative des différentes espèces microbiennes présentes dans un écosystème. Elles autorisent également l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, la comparaison de leurs communautés respectives ainsi que le suivi des évolutions de structure de ces communautés. Ces techniques sont basées sur la séparation des séquences amplifiées par migration différentielle sur gel d'agarose ou de polyacrylamide ou par électrophorèse capillaire en fonction de leurs séquences (DGGE, TGGE), de leurs conformations (SSCP) ou de leurs tailles (ARDRA, t-RFLP, RISA).

DGGE et TGGE

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) constitue l'une des méthodes d'empreintes moléculaires les plus utilisées (Schäfer et Muyzer, 2001). Sa première utilisation, en écologie microbienne, remonte à 1993 où cette technique s'est avérée efficace dans l'étude de la composition de consortium bactérien en ciblant la région variable V3 du gène codant l'ARNr 16S (Muyzer et al., 1993). Le principe de séparation des produits d'amplification repose sur la conformation qu'adoptent des séquences nucléotidiques double brin de taille identique au cours de leur migration dans un gel de polyacrylamide en condition dénaturante (chimique pour la DGGE et thermique pour la TGGE ou Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

La diversité de communautés microbiennes a été étudiée par DGGE dans divers environnements (Muyzer et Smalla, 1998). Récemment, cette technique a permis l'analyse de la diversité des communautés procaryotiques extraites à partir d'écosystèmes profonds terrestres (Fry et al., 2009; Kovacik et al., 2006), océaniques (Lysnes et al., 2004; Parkes et al., 2005; Thorseth et al., 2001; Webster et al., 2006; Webster et al., 2003) et pétrolifères (Wang et al., 2008; Yoshida et al., 2005). Elle a également été développée pour accéder à la diversité de communautés fonctionnelles comme celles responsables de la réduction des sulfates (Geets et al., 2006) ou encore optimisée pour la détection sélective des populations microbiennes actives dans les sédiments marins par CM-DGGE (Co-migration DGGE) (Roussel et al., 2009). Une forte corrélation entre les profils géochimiques relevés dans des sédiments océaniques (ODP Leg 201, sites 1228 et 1229) et les activités procaryotiques a également été démontrée par l'utilisation de profils DGGE comme variables statistiques d'analyse en composante princi (Fry et al., 2006).

La DGGE présente, cependant, des limitations et des inconvénients. Une surestimation du nombre réel de taxons peut être induite par la visualisation de molécules hétéroduplexes (molécules chimères) formées lors de par l'amplification PCR et la détection des micro-hétérogénéités présentes dans les multiples copies du gène d'intérêt d'une même souche (Kowalchuk et al., 1997; Nubel et al., 1996). A l'inverse, la co-migration de fragments d'ADN distincts peut entraîner une sous-estimation de la diversité (Malik et al., 2008). Néanmoins, la détection des micro-hétérogénéités de séquences démontre la bonne sensibilité de cette technique.

La DGGE, comme les autres méthodes basées sur une électrophorèse sur gel, ne permet de séparer que de courts fragments d'ADN, limitant leur contenu en information phylogénétique.

Néanmoins, le principal avantage de la DGGE réside dans la possibilité d'affiner les résultats obtenus directement à partir du gel par (i) excision et séquençage des bandes d'intérêt (d'environ 500 paires de bases) permettant l'identification des membres d'une communauté ou (ii) hybridation sur membrane (où figure l'empreinte du profil DGGE) de sondes spécifiques marquées pour une identification de groupes microbiens particuliers. Cette méthode s'est également avérée reproductible dans de nombreuses études (Hong et al., 2007; Muyzer et Smalla, 1998). De plus, si la diversité microbienne mise en évidence est faible, le profil DGGE suffit pour définir le nombre d'OTU (unités taxonomiques opérationnelles) présentes dans un échantillon et ainsi de déterminer la complexité d'une communauté (Ranjard et al., 2000).

SSCP / CE-SSCP

La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), initialement mise au point pour la détection rapide de mutations génétiques chez l'homme, est une électrophorèse réalisée en condition non dénaturante. Le principe de séparation de cette technique est basé sur la migration différentielle de fragments d'ADN simple brin et de taille identique en fonction de leur conformation secondaire (Hebenbrock et al., 1995). En CE-SSCP (CE pour Capillary Electrophoresis), seuls les fragments PCR mono brins présentant une extrémité marquée grâce à l'utilisation d'une amorce fluorescente lors de la PCR sont détectés par laser. Les analyses SSCP et CE-SSCP ont de nombreuses applications. Par exemple, elles ont permis l'étude de la structure et de la diversité de populations microbiennes à partir de divers écosystèmes (Chachkhiani et al., 2004; Delbès et al., 1998; Lee et al., 1996; Zumstein et al., 2000), ou encore la discrimination d'isolats bactériens (Widjoatmodjo et al., 1994). En plus de l'analyse de la diversité microbienne, l'utilisation de la CE-SSCP a permis de mettre en évidence la dynamique des populations procaryotiques endogènes de cheminée hydrothermale océanique active au cours du suivi de microcosmes (Byrne et al., 2009). Ross et al. (2001) ont également observé des variations dans la communauté microbactérienne originaire d'aquifère de subsurface lors de l'application de différentes stratégies de bioremédiation.

La CE-SSCP offre certains avantages par rapport aux autres techniques existantes. De par sa nature haut débit, elle permet de traiter simultanément et rapidement de nombreux échantillons (jusqu'à 96 par analyse). Le contrôle automatique des conditions d'électrophorèse et l'ajout d'un standard interne permet de pallier aux problèmes de variations gel à gel et ainsi, d'acquérir une haute reproductibilité de la technique. De plus, la CE-SSCP permet une meilleure résolution que la DGGE, en terme de nombre total de pics détectés, en réduisant les phénomènes de co-migration de séquences

(Hong et al., 2007). Toutefois, la séparation des fragments amplifiés est optimale pour des séquences de longueur comprise entre 150 et 400 bases, soit beaucoup plus courtes et moins informatives que celles utilisées en DGGE. De plus, une saturation des profils CE-SSCP a été rapportée lors de l'étude de systèmes complexes comptant plus de 35 pics (Loisel et al., 2006). Enfin, à l'inverse de la technique de DGGE, l'identification directe des pics obtenus par CE-SSCP reste complexe voire impossible.

ARDRA et t-RFLP

La technique ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) nécessite la digestion préalable des fragments d'ADN amplifiés par des enzymes de restriction avant séparation sur gel. De ce fait, les profils obtenus sont fortement dépendants des enzymes de restriction sélectionnées (Gich et al., 2000). Les enzymes de restriction principalement utilisées reconnaissent des sites de 4 paires de bases retrouvés en moyenne tous les 4^4 bases. La longueur des fragments générés peut ainsi être estimée à 0,26 kb (soit $4^4=256$). Cette technique s'est révélée efficace dans la discrimination d'espèces et de sous espèces phylogénétiquement proches isolées d'environnements profonds (da Cunha et al., 2006; Wery et al., 2002; Zlatkin et al., 1996) et dans la différenciation de clones environnementaux (Ravenschlag et al., 1999). Toutefois, la production d'un grand nombre de fragments par digestion rend cette technique peu propice à la détection de groupes phylogénétiques spécifiques et à l'étude de la diversité microbienne à partir d'environnements naturels (Liu et al., 1997).

Une méthode alternative, basée sur le principe de l'ARDRA, a été mise au point par l'utilisation d'une amorce marquée en 5' terminal lors de l'étape de PCR. Le marquage terminal des séquences amplifiées permet de détecter uniquement les fragments terminaux digérés d'où le nom de t-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism). La séparation des fragments est réalisée par migration électrophorétique en condition dénaturante (Liu et al., 1997). De manière générale, le polymorphisme des séquences microbiennes permet d'associer un fragment terminal de taille donnée à une espèce spécifique (Marsh, 1999). Néanmoins, plusieurs espèces peuvent présenter des fragments terminaux de longueurs identiques (Dorigo et al., 2005). Comme pour la SSCP, la t-RFLP peut être combinée à une électrophorèse capillaire qui améliore la résolution et la sensibilité de détection par laser. En outre, les avantages de cette technique sont sa capacité à détecter les membres minoritaires d'une communauté microbienne et sa bonne reproductibilité.

L'utilisation de la t-RFLP a permis l'analyse et la caractérisation microbiologique d'environnements profonds variés tels que les marnes noires (Inagaki et al., 2005), l'eau d'aquifère de

subsurface (Takai et al., 2001b), les basaltes océaniques (Mason et al., 2009) ou encore les cheminées hydrothermales (Brazelton et al., 2006). Une organisation structurée des communautés archéennes, avec variation de la composition et de l'abondance, a également été démontrée par t-RFLP au sein des parois de cheminées hydrothermales actives (Takai et al., 2001a) et des sédiments marins profonds (Inagaki et al., 2001). L'analyse des profils t-RFLP a aussi été utilisée pour comparer la structure des populations originaires des roches à celle extraites des fluides de forage et de sols de surface ou des eaux de service et de l'air ambiant, représentant de potentiels vecteurs de contamination durant les opérations de forage (Onstott et al., 2003; Zhang et al., 2005). Un accroissement des communautés bactériennes aérobies cultivables et extraites à partir d'échantillons naturels de paléosol ont été observés par RFLP en fonction des durée de stockage, démontrant que les conditions de stockage (ici oxygène et à température ambiante) influencent l'évolution des populations microbiennes séquestrées (Chandler et al., 1997). De plus, cette approche a également été adaptée à certains gènes de fonction (Bruce, 1997).

Comme tout outil moléculaire, la t-RFLP présente des inconvénients dont certains sont communs avec la technique de l'ARDRA. La première contrainte réside dans le choix des enzymes de restriction qui est une étape essentielle dans l'obtention de profils résolutifs. À chaque enzyme de restriction sera associé un profil t-RFLP. De plus, une digestion incomplète des produits PCR entraîne la formation de pseudo-fragments de restriction terminaux provoquant une surestimation de la diversité microbienne totale (Egert et Friedrich, 2003). Il est aussi important d'utiliser individuellement deux à quatre enzymes de restriction afin de vérifier et de valider le ou les premiers profils et s'assurer de la qualité des résultats obtenus (Osborne et al., 2006; Tiedje et al., 1999). Enfin, Engebretson et Moyer (2003) ont montré que la t-RFLP pouvait s'avérer utile pour estimer la diversité de communauté caractérisée par une richesse faible à moyenne (à l'échelle de l'espèce) mais inappropriée à l'étude de populations procaryotiques complexes.

RISA et ARISA

La technique PCR-dépendante RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) implique l'amplification de la séquence d'ADN intergénique (*IGS*), située entre les gènes codant l'ARNr 16S et l'ARNr 23S dans l'opéron *rrn*. Cette région est extrêmement variable, en termes de longueur (50 à plus de 1500 kb) et d'enchainements nucléotidiques, d'une espèce à l'autre et entre les différents opérons d'une même bactérie (Garcia-Martinez et al., 1999). Néanmoins, chez certaines espèces, cette région semble relativement bien conservée (Antón et al., 1998; Luz et al., 1998). Les amorces définies pour

l'amplification de cette séquence ciblent des régions conservées des gènes 16S et 23S (Garcia-Martinez et al., 1999). Les différents produits PCR générés sont directement séparés en fonction de leur taille sur gel d'agarose ou d'acrylamide (Garcia-Martinez et al., 1999 ; Martin-Laurent et al., 2001). La technique ARISA est une version automatisée de la RISA. La détection des amplicons est réalisée grâce à une amorce fluorescente par laser lors d'une électrophorèse capillaire.

L'utilisation de la RISA/ARISA s'est révélé un outil puissant dans la distinction de souches fortement apparentées assimilées au même genre (Nour et al., 1994). De plus, l'ARISA s'est avérée être une méthode reproductible, hautement résolutive, sensible et efficace pour la discrimination de communautés fongiques et bactériennes à partir d'échantillons naturels de surface (Ranjard et al., 2001). D'ailleurs, l'étude de Danovaro et al. (2006) a montré que cette approche pouvait détecter la présence de taxons bactériens représentant moins de 5% des produits PCR totaux. En écologie microbienne, cette méthode a également été utilisée pour mettre en évidence les variations de biodiversité dans divers sols induites par l'activité anthropique (Borneman et Triplett, 1997; Lear et Lewis, 2009) ou encore dans la colonne d'eau de mer, prouvant une stratification de populations procaryotiques distinctes en fonction de la profondeur (Acinas et al., 1999). En revanche, cette méthode n'a jamais été employée lors de recherches menées sur les environnements de subsurface.

Du fait de la grande variabilité des séquences amplifiées, la résolution taxonomique est plus fine que celle obtenue grâce à l'ARNr 16S. La RISA est particulièrement adaptée à la taxonomie. A l'inverse, la résolution à l'échelle de la sous-espèce peut mener à l'acquisition de profils RISA complexes et difficilement interprétables pour des applications environnementales (Spiegelman et al., 2005). De plus, même s'il existe des banques de données spécifiques aux séquences *IGS*, le nombre de séquences disponibles reste trop faible pour permettre une identification convenable (Ranjard et al., 2000; Spiegelman et al., 2005).

Les outils moléculaires PCR-dépendants sont fréquemment utilisés dans les travaux de recherche traitant d'environnements de subsurface. Malgré les nombreux biais (inhérents à chaque étape et à chaque méthode), ces derniers pourraient être moins importants que ceux induits lors des opérations d'échantillonnages et ceux relatifs à l'analyse des résultats (Morris et al., 2002). Les différentes techniques d'empreintes moléculaires ont, sans aucun doute, favorisé les récentes avancées dans le domaine des connaissances fondamentales de la biosphère profonde et contribué à la réflexion sur les mécanismes se déroulant *in-situ*.

L'ensemble de ces méthodes fournit une représentation de l'abondance relative des diverses espèces présentes dans une communauté ainsi que la diversité totale présente. Une quantification précise des

différentes populations procaryotiques, taxonomiques et fonctionnelles, peut être réalisée par PCR compétitive et PCR en temps réel (Inagaki et al., 2004). L'extraction d'ARN offre une vision ciblée sur les communautés microbiennes actives (Roussel et al., 2009). Néanmoins, l'analyse de l'expression génique ne procure qu'une mesure indirecte des activités microbiennes.

4. Retombées et applications de la connaissance de la biosphère profonde

Longtemps considérée comme impropre au développement de la vie, le sous-sol profond est maintenant reconnu pour renfermer une part significative de la population microbienne (Whitman et al., 1998). Néanmoins, de par leur accessibilité limitée, les environnements de subsurface représentent encore des systèmes relativement inexplorés. Par conséquent, l'échantillonnage de faciès géologiques issus de forages profonds constitue de rares opportunités d'explorer la microbiologie des biotopes de subsurface afin de mieux appréhender le rôle des micro-organismes dans le fonctionnement de ces écosystèmes.

D'un point de vue purement fondamental, l'étude de la biodiversité endogène de ces écosystèmes offre des occasions uniques d'examiner les mécanismes écologiques et évolutifs, l'organisation et la distribution des communautés du sous-sol ainsi que les interactions microbiennes présentes *in-situ*. L'ensemble de ces « nouvelles » connaissances permettront, à terme, de mieux appréhender les mécanismes biogéochimiques se déroulant dans les profondeurs de la Terre. De plus, les récentes avancées scientifiques dans le domaine de la géomicrobiologie soulèvent de nouvelles questions passionnantes quant à l'utilisation des ressources biodisponibles par les microorganismes (Pedersen, 1997; Stevens et McKinley, 1995), les adaptations métaboliques et physiologiques des populations autochtones face à des conditions environnementales peu favorables (Amend et Teske, 2005; Fredrickson et Onstott, 1996; Wolfe-Simon et al., 2011), les limites de vie procaryotique ou encore la conservation de biomolécules sur des temps géologiques et leur utilisation dans l'interprétation d'évènements passés (Inagaki et al., 2005). De plus, certains auteurs argumentent en faveur de l'apparition d'une vie primitive à proximité des environnements hydrothermaux comme les sources hydrothermales océaniques profondes, à l'abri des rayonnements solaires (Holm, 1992; Pace, 1991). Les recherches menées sur les environnements profonds sont ainsi susceptibles d'apporter des informations intéressantes sur l'origine et les limites de la vie.

Les recherches conduites sur la biosphère profonde apportent non seulement une amélioration des connaissances fondamentales mais offrent également des perspectives d'applications immédiates ou futures dans les domaines de l'industrie et des biotechnologies. L'isolement de nouvelles espèces microbiennes endogènes des profondeurs offrent des opportunités dans la découverte de nouvelles molécules et autres principes actifs d'intérêts thérapeutiques, pharmaceutiques et industriels. En effet, les microorganismes extrêmophiles représentent une source potentielle de nouveaux procédés biotechnologiques. Comme exemples peuvent être cités l'utilisation courante de l'ADN Taq polymérase, issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Brock et Freeze, 1969), enzyme à la base du développement des techniques de biologie moléculaire, ou encore l'utilisation de populations bactériennes extrêmophiles actives dans les opérations d'extraction de minerais (cuivre, or, cobalt, nickel), ou biolixiviation, à l'échelle industrielle (Rawlings et Johnson, 2007). Cette dernière approche, conciliant valorisation des ressources minérales et développement durable, peut être considérée comme un procédé industriel « propre » au même titre que les technologies de bioremédiation. Les réservoirs pétroliers constituent une ressource inestimable en microorganismes potentiellement capables de dégrader les hydrocarbures (nous avons vu précédemment l'existence des phénomènes de biodégradation *in-situ* des hydrocarbures). L'utilisation de souches autochtones permettrait ainsi une dépollution « verte » des sites contaminés par ce type de composés. De plus, la biodégradation complète et naturelle de certains contaminants résultant de l'activité anthropique, a pu être observée dans des environnements profonds (Mc Kinley, 2000). La biosphère profonde n'a pas encore révélé toutes ses potentialités. Dans le futur, la prospection active des bio-richesses et bio-ressources du sous-sol amèneront certainement à des découvertes majeures dans le domaine des biotechnologies.

En contrepartie, l'activité des communautés microbiennes du sous-sol peut induire des effets néfastes sur les exploitations humaines de ces ressources. L'industrie pétrolière est directement affectée par les activités microbiennes qui se déroulent dans les couches profondes causant la corrosion des aciers, le colmatage des puits d'injection et autres équipements de surface et les phénomènes de souring (corrosion anaérobie par la production d'hydrogène sulfuré). Leur impact économique est considérable sur la budgétisation d'un projet. Rien que la remise en état des installations affectées par la corrosion anaérobie peuvent représenter jusqu'à 2% du budget total (Al-Rasheedi et al., 1999). De ce fait, l'intérêt des industriels pour le développement de ces bioprocédés est principalement économique, notamment par la réduction des coûts d'exploitation et de production. Par exemple, l'amendement en nitrate et nitrite des eaux d'injection permet de diminuer le souring des réservoirs pétroliers. Ce traitement rapide est peu coûteux par rapport à la méthode traditionnelle (addition de biocides) et également moins nocif pour l'environnement et l'homme (Sunde et Torsvik, 2005). L'attrait économique de l'utilisation des microorganismes a favorisé le développement de

nouvelles stratégies utilisant différents produits du métabolisme bactérien comme bio-surfactant, bio-émulsifiant, solvant... (McInerney et al., 2005). Ces techniques regroupées sous le terme MEOR (Microbially Enhanced Oil Recovery) ont pour finalité l'amélioration de la production énergétique. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes microbiens *in-situ* permettrait une diminution des coûts d'exploitation par la prédiction des réservoirs à risques et la prévention de tels phénomènes.

De par leur nature confinée, les environnements profonds sont considérés comme de potentiels sites de séquestration du CO₂ ou de stockage de déchets radioactifs. Il est évident que la création de telles installations implique des modifications des propriétés des écosystèmes-hôtes et par conséquent des variations dans la composition des communautés endogènes. En outre, il est important de savoir si les microorganismes de subsurface interagissent avec la zone de stockage et, si tel est le cas, quelles peuvent être leurs contributions. Est-ce que cette biosphère est capable de sécuriser les zones de stockage par des processus de biominéralisation, d'assimilation ou tout autre mécanisme présentant des potentialités de rétention ? A l'inverse, quels peuvent être les effets négatifs induits par la présence de ces communautés (autochtones et allochtones) ?

La combustion des énergies fossiles produit à elle seule 56,6 % des émissions annuelles mondiales en équivalent CO₂ et représente le principal gaz à effet de serre anthropogénique (IPCC, 2007). Comme il est tacitement admis que les pays industrialisés sont en grande partie responsables de la situation actuelle, les industriels sont à la recherche de technologies nouvelles qui leur permettraient de réduire efficacement leurs taux d'émissions. L'injection de CO₂ dans la subsurface représente l'une des stratégies d'avenir. Cet isolement physique du CO₂ représente une alternative relativement peu coûteuse et technologiquement proche de certaines méthodes extractives des pétroles. D'un point de vue microbiologique, seules quelques études relatent des interactions entre le CO₂ injecté (sous forme supercritique) et les microorganismes (Basso et al., 2009; Ménez et al., 2007). L'une des plus récentes a constaté une diminution drastique de la biomasse totale active dans les premiers jours après l'injection avec en parallèle une augmentation de la fraction des méthanogènes, démontrant l'action quasi instantanée de l'injection de CO₂ sur l'abondance et la composition des communautés microbiennes. De plus, une adaptation des microorganismes endogènes aux importantes variations des paramètres environnementaux (pH, température), et notamment des BSR responsables des phénomènes de souring, a également été observée et ce malgré une pérennité des conditions défavorables (Morozova et al., 2010).

Dans le domaine du stockage de déchets radioactifs, seuls sont concernés les déchets radioactifs de moyenne et de haute activité à vie longue (MHA-VL). Ces déchets représentent 5% du volume total des déchets radioactifs produits en France (soit environ 85000 m³ environ), mais plus de 96% de la

radioactivité totale. Le concept de stockage en couches géologiques profondes repose sur un modèle de confinement multi-barrières. Les pays tels que le Canada, les Etats Unis, la Suède, la Hongrie, la Suisse, la Belgique ou encore la France, envisagent le confinement des déchets MHA-VL en conteneurs résistants à la corrosion et leur stockage au niveau de couches sédimentaires profondes présentant une grande stabilité tectonique et susceptibles de constituer une barrière naturelle efficace pour confiner la radioactivité et empêcher le transfert de radionucléides vers la surface sur des échelles de temps pouvant atteindre le million d'années (Ericsson, 1999; Thury et Bossart, 1999). Comme la disponibilité en eau représente l'un des facteurs influençant principalement le développement microbien, les faciès géologiques profonds non perméables et ductiles constituent des environnements de choix (Fredrickson et Balkwill, 2006).

De plus, des sites expérimentaux constituent des zones exceptionnelles pour l'étude des interactions microorganismes/déchets radioactifs. Par exemple sur le site de Severnyi en Sibérie, des déchets radioactifs liquides ont été directement injectés dans la subsurface depuis 1967. L'étude de Nazina et al. (2004) a mis en évidence l'existence d'une communauté procaryotique métaboliquement diversifiée dont la densité cellulaire et le niveau d'activité étaient plus élevés dans la zone de dispersion de la radioactivité qu'aux niveaux des points d'injection. Cette augmentation d'activité a eu pour conséquence une diminution de la mobilité de certains radionucléides, le sulfure d'hydrogène favorisant la précipitation des métaux, mais également une remontée de la radioactivité vers la surface sous l'effet d'une augmentation de pression induite par la production microbienne de gaz.

L'ensemble de ces travaux démontrent qu'une meilleure connaissance des processus microbiens profonds aboutirait à une meilleure gestion des sites de stockage. Globalement, une meilleure compréhension des processus biogéochimiques se déroulant dans les environnements de subsurface permettra d'évaluer et de réduire les risques et les coûts industriels lors de l'exploitation humaine du sous-sol (mines, forages pétroliers, forages géothermiques, sites de stockage) mais également une meilleure gestion des ressources naturelles.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

A. Des roches sédimentaires profondes comme matrices d'étude...

A.1. Sites d'étude et échantillons

A.1.1. Contexte géo-morphologique du Bassin Parisien et site d'étude

Enclavé entre les Ardennes au Nord, le Massif Armoricain à l'Ouest, le Massif Central au Sud et les Vosges à l'Est, le Bassin Parisien constitue un des sous-bassins appartenant au vaste Bassin d'affaissement intracratonique Anglo-Parisien-Belge. Bien que l'évolution des bassins d'affaissement soit essentiellement contrôlée par le refroidissement de la lithosphère (contrôle thermique), la géomorphologie d'un bassin résulte, en réalité, de la succession et de la combinaison des différents phénomènes de subsidence (étirement - affaissement – flexuration¹⁵).



Figure 17. Contexte géologique générale du Bassin Parisien

De forme ovoïde et de diamètre avoisinant les 500 km, le Bassin Parisien repose sur un socle Hercynien (ante-Permien). Il renferme une succession de couches sédimentaires datées du Secondaire et du Tertiaire dont l'épaisseur totale peut atteindre les 3000 mètres. Ces terrains sont disposés en larges auréoles concentriques dites en « piles d'assiettes » dont les plus récentes affleurent dans la partie centrale et les plus anciennes sur les pourtours (figure 17). Cet empilement est la conséquence de la subsidence du Bassin Parisien à l'ère Secondaire et Tertiaire avec soulèvement de ses marges septentrionale, orientale et méridionale (Brunet et Le Pichon, 1982; Pomerol, 1974). En outre, les

¹⁵ Flexuration : réaction viscoélastique induite par une décharge (fonte de glace, érosion, ...) ou inversement à une charge (eau, glace, sédiments, ...) de la croûte terrestre.

terrains d'âge Triasique sont très bien représentés à l'Est du Bassin alors qu'ils le sont très peu à l'Ouest et au Sud (figures 17 et 18). Les événements géologiques et climatiques principaux, comme les cycles de transgression et de régression marine, les érosions ou encore les épisodes de continentalisation, ont été enregistrés au sein des couches sédimentaires. Ainsi, la formation du Bassin Parisien aurait commencé, au minimum, il y a 240 millions d'années, pendant l'ère triasique (De Wever et al., 2002).

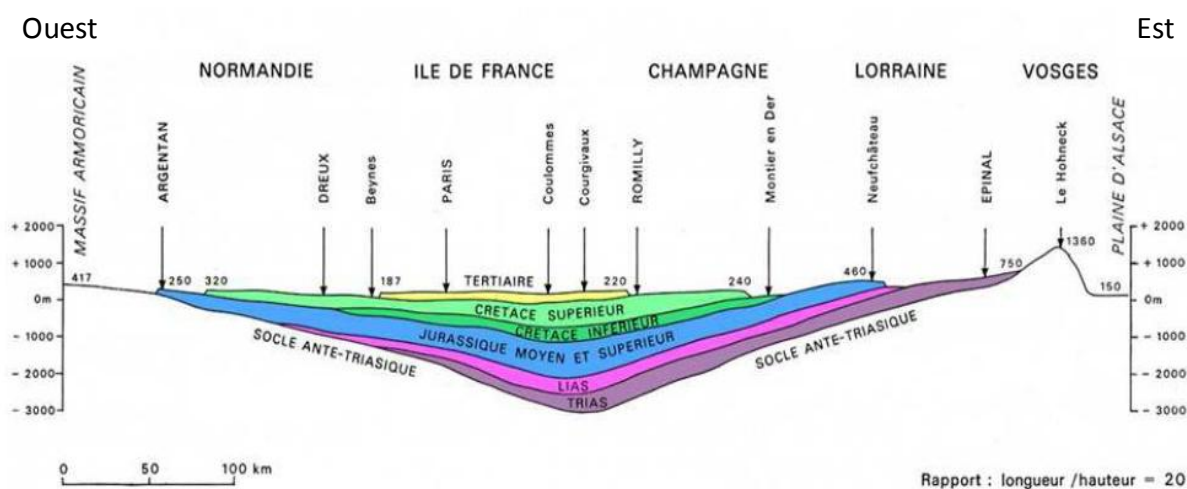


Figure 18. Coupe schématique de l'organisation des dépôts sédimentaires du Bassin Parisien (d'après (Cavelier et al., 1979).

Dans le cadre du choix d'un site de stockage de déchets radioactifs MHA-VL en couches géologiques profondes, l'ANDRA a délimité une zone d'environ 250 km² dans l'Est du Bassin Parisien, nommée « zone de transposition du laboratoire souterrain de Meuse/Haute Marne ». Cette zone de transposition (ZT) correspond à une zone géographique géologiquement équivalente au laboratoire souterrain et à l'intérieur de laquelle les propriétés des argilites du COx (couche ciblée pour le stockage de déchets radioactifs) sont équivalentes à celles décrites en laboratoire. L'étude de cette ZT a nécessité la réalisation de quatre plateformes de forages, dont une localisée en position centrale (plateforme C) (figure 19). La plateforme C, située sur la commune de Montiers-sur-Saulx dans la Meuse, se composait de trois forages nommés EST 431, EST 432 et EST 433. Les échantillons qui ont été étudiés dans le cadre de cette thèse sont tous issus du forage profond EST433.

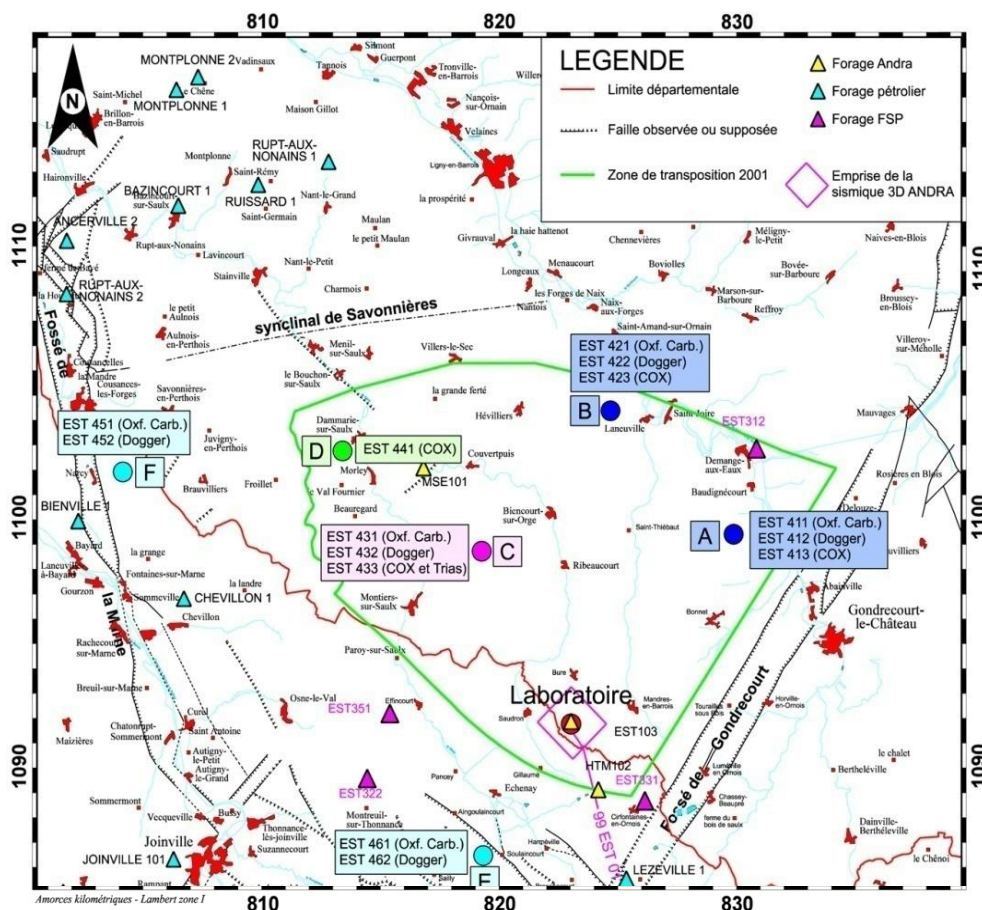


Figure 19. Localisation des plates-formes de forages de la campagne ZT 2007-2008.

A.1.2. Modalités techniques du forage EST 433

Comme énoncé plus haut, le forage EST433 fait partie des trois forages composant la plateforme C localisée au centre de la ZT. Le forage EST 433 a été le seul ouvrage de la campagne de reconnaissance de la ZT ayant pour objectif d'atteindre le toit du Permien afin de compléter les connaissances sur les aquifères profonds (transferts, écoulement) et d'évaluer le potentiel géothermique du Trias.

La procédure retenue a été le forage en destructif et le carottage en boue à base d'eau ou d'huile selon la lithologie des faciès traversés. La boue à base d'huile, utilisée pour les formations argileuses et évaporitiques permet de limiter les interactions des fluides de forage avec la roche et ainsi d'améliorer la tenue des parois du puits. De plus, la circulation de boue lors du carottage augmente le taux de récupération des passes. Il est à remarquer qu'aucune précaution d'asepsie particulière n'a été appliquée durant les opérations de forages ni au cours du relevé géologique des carottes par l'équipe de géologues présents sur site.

Sur le forage EST433, un avant-trou a été réalisé grâce à un forage à percussion destructif sous air de 0 à - 517 mètres (soit 30 m au-dessus du toit de la couche argileuse callovo-oxfordienne). La campagne de prélèvements (effectués à l'aide d'un forage rotatif) s'est ensuite déroulée en trois phases d'avril à juin 2008 (tableau 3) :

- En avril, un carottage continu en boue à huile a été mené de 526 m à 770 m de profondeur, par tronçons successifs de 9 mètres, permettant de carotter la base de l'Oxfordien, le Callovo-Oxfordien entièrement ainsi qu'une partie de la formation du Dogger. Ces carottages correspondent aux passes K1 numérotées de 1 à 29.

Le reste de l'ouvrage (de - 770 à - 2001 m) a été foré en destructif avec carottage ponctuel, tous les 50 à 70 m, de passes mesurant environ 9 m.

- En mai, les passes K2-1 à K2-7 et K2-9 à K2-17 ont été extraites entre 770 et 1730 m de profondeur toujours en présence d'une circulation de boue à huile. L'absence d'une passe a été provoquée par une mauvaise interprétation de la série stratigraphique. En effet, la carotte K02-09 n'a pas été prélevée mais pour des raisons de simplicité la carotte K02-08 a été renommée en K2-09 afin de ne pas décaler la numérotation des carottes suivantes.
- En juin, le carottage discontinu a été réalisé en boue à base d'eau. Les passes K2 forées entre 1730 et 2001 m de profondeur ont été numérotées de 18 à 21.

Une déviation significative du forage a été enregistrée en trajectométrie dans la partie profonde (annexe 1). La déviation globale mesurée sur les 2001 m de longueur forée est égale à 8,3°. La profondeur verticalisée correspondante a été estimée à 1979,97 m. De plus, aux vues des contraintes mécaniques drastiques imposées au fond du trou, la dernière passe carottée (K2-21) ne mesurait qu'1 m 40 de long au lieu des 9 mètres attendus.

Une fois remontées sur le plancher, les passes ont été extraites des carottiers et nettoyées à l'aide de chiffons propres. L'intégralité des carottes a été reconstruite sur la table de relevé géologique. La génératrice de sens a été tracée (de la tête vers le pied) et la totalité de la passe photographiée. La sédimentologie et les éléments structuraux présents au sein des carottes ont ensuite été décrits par les géologues présents sur site. Par conséquent, les échantillons ont été disponibles 60 à 90 minutes après leur remontée à la surface.

A.1.3. Les échantillons étudiés

Les roches sédimentaires profondes du Trias

Sur l'ensemble de la campagne de prélèvement, 21 échantillons issus de 9 passes distinctes nous ont été confiés (tableau 3) mais seuls quatre échantillons naturels appartenant aux formations géologiques du Trias, et donc faisant partie des carottes les plus profondes extraites lors du forage EST433, ont fait l'objet d'études microbiologiques approfondies. Il s'agit de portions de roches sédimentaires datées du Trias moyen et appartenant aux carottes K2-17, K2-18, K2-19 et K2-20 (figure 20 et tableau 3).

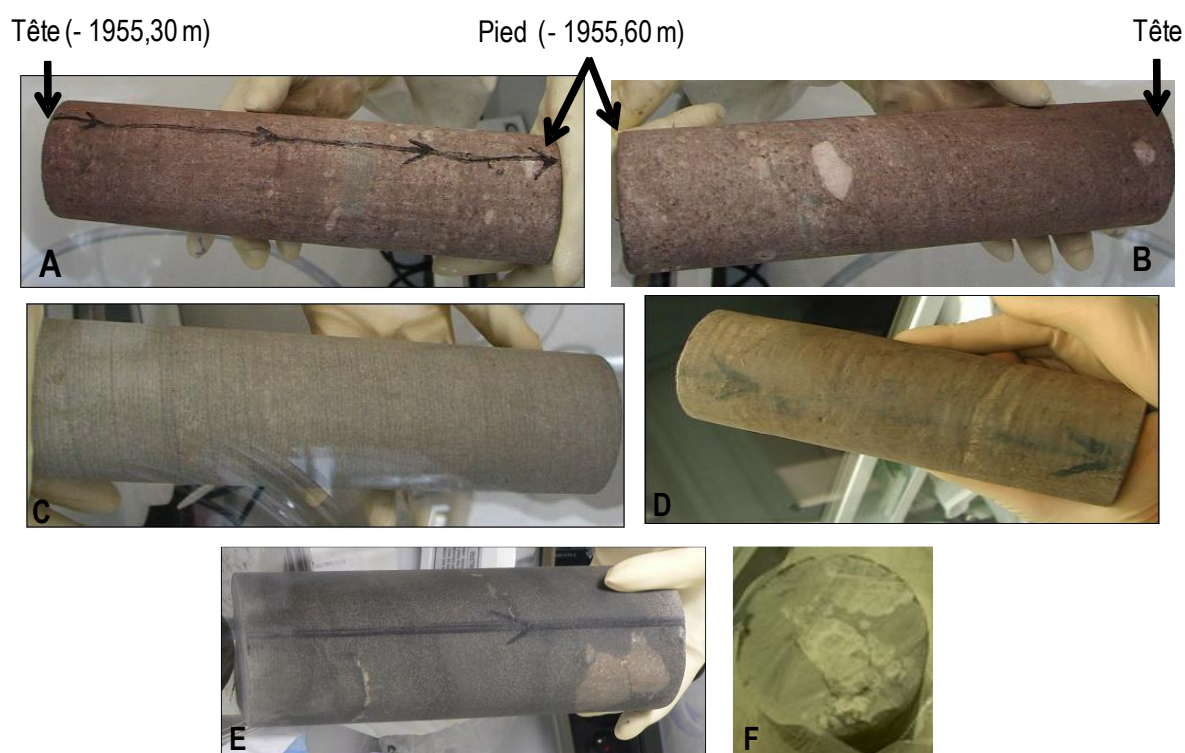


Figure 20. Echantillons de roches sédimentaires carottées dans les compartiments du Trias moyen. (A) et (B) échantillon K2-20 référencé sous l'appellation ANDRA : EST31465, (C) échantillon K2-19 référence ANDRA EST31602, (D) échantillon K2-18 référence ANDRA EST3572, (E) et (F) échantillon K2-17 référence ANDRA EST31386. Le traçage de la génératrice de sens facilite le repérage des côtes d'une carotte.

Tableau 3. Récapitulatif des échantillons naturels originaires du forage EST433. Les sections de carotte considérées au cours de ces travaux apparaissent sur fond gris. Dans le but de conserver une portion de carotte dans une cellule sous pression, certains échantillons du Trias (en hachuré) ont été amputés de 9 cm. La carotte K2-21, qui constitue la carotte de fond de trou, a été entièrement stockée sous pression.

Dates de prélèvement	Numéros des passes	Référence ANDRA des échantillons	Profondeurs forées (m)		Diamètre des passes (cm)	Nature des boues
			de	à		
16/04/08	K1-11	EST29283	618,30	618,60	10,1	Huile
		EST29284	618,60	618,90		
18/04/08	K1-15	EST29389	659,50	659,80	10,1	Huile
		EST29390	659,80	660,10		
19/04/08	K1-19	EST29490	691,95	692,25	10,1	Huile
		EST29491	692,25	692,55		
07/05/08	K2-01	EST30907	799,60	799,90	10,1	Huile
		EST30908	800	800,30		
23/05/08	K2-17	EST31386	1726,70	1727	10,1	Huile
		EST31387	1727	1727,30		
		EST31390	1727,30	1727,60		
01/06/08	K2-18	EST31571	1822,80	1823,10	6,3	Eau
		EST31572	1823,10	1823,40		
		EST31570	1823,45	1823,75		
02/06/08	K2-19	EST31602	1885,15	1885,45	6,3	Eau
		EST31603	1885,45	1885,75		
		EST31604	1885,75	1886,05		
04/06/08	K2-20	EST31465	1955,30	1955,60	6,3	Eau
		EST31466	1955,60	1955,90		
		EST31467	1955,90	1956,20		
06/06/08	K2-21	EST31489	1999,68	1999,78	6,3	Eau

Les fluides de forage

La collecte de fluide de forage a été un moyen de pallier à l'absence d'injection de traceurs de contamination par la détermination du « fond » de populations microbiennes, potentiellement exogènes, introduites lors du forage. Par conséquent, environ un litre de fluide de forage a été récupéré avant et après chaque carottage de manière à avoir une correspondance temporelle et spatiale avec les

différentes carottes de roches extraites. Les boues de forage appartiennent à deux catégories distinctes : les boues dites à l'huile, composées essentiellement de gazole, et les boues à l'eau (ou encore appelées boues aux polymères). Les propriétés et la formulation des deux boues sont données en annexe 2. La confection des boues à l'eau étant propre à chaque société de forage, leur formulation exacte ne nous a pas été communiquée. Comme l'indique le tableau 3, seuls les échantillons du Trias originaires de la passe K2-17 ont été en contact avec la boue à huile. Le fluide circulant ayant permis les opérations de forage et de carottage des compartiments géologiques inférieurs était à base de boue à l'eau.

A.1.3.1. Pré-conditionnement des échantillons sur site

Le plus rapidement possible après leur fractionnement en tronçons de 30 cm, les carottes de roche ont été placées dans des sacs plastiques stériles. Seuls les échantillons EST31387, EST31572, EST31603 et EST31467 ont subi une découpe supplémentaire les raccourcissant de 9 cm. Tous les échantillons, y compris les échantillons « courts » destinés au stockage dans l'enceinte haute pression et notés « bis », ont fait l'objet du même pré-conditionnement. L'ensemble a été disposé dans des fûts en inox pour leur transport jusqu'au laboratoire de l'ANDRA (Bure) où s'est déroulé le pré-conditionnement en boîte à gants (BAG).

Avant chaque intervention, l'enceinte anaérobie (ou BAG) a subi une décontamination à l'aide d'un bactéricide/fongicide (bactinyl, Inter Médical FOCSE, France) et d'éthanol 96%. A l'intérieur de la BAG, seul du matériel stérilisé (à 121°C pendant 30 minutes) a été utilisé et les échantillons ont été manipulés à l'aide de gants stériles. La surface des carottes a été soigneusement essuyée à l'aide de papier absorbant stérile imbibé d'éthanol absolu. Après séchage complet, les échantillons ont été introduits dans de nouveaux sacs plastiques stériles scellés sous atmosphère inerte (N₂) et l'ensemble a été ensuite placé dans une première enveloppe aluminisée. A l'extérieur de la BAG, l'enveloppe aluminisée a été tout d'abord partiellement scellée puis a subi deux cycles vide/azote avant d'être finalement scellée sous azote et surconditionnée dans une seconde enveloppe aluminisée sous vide (figure 21).

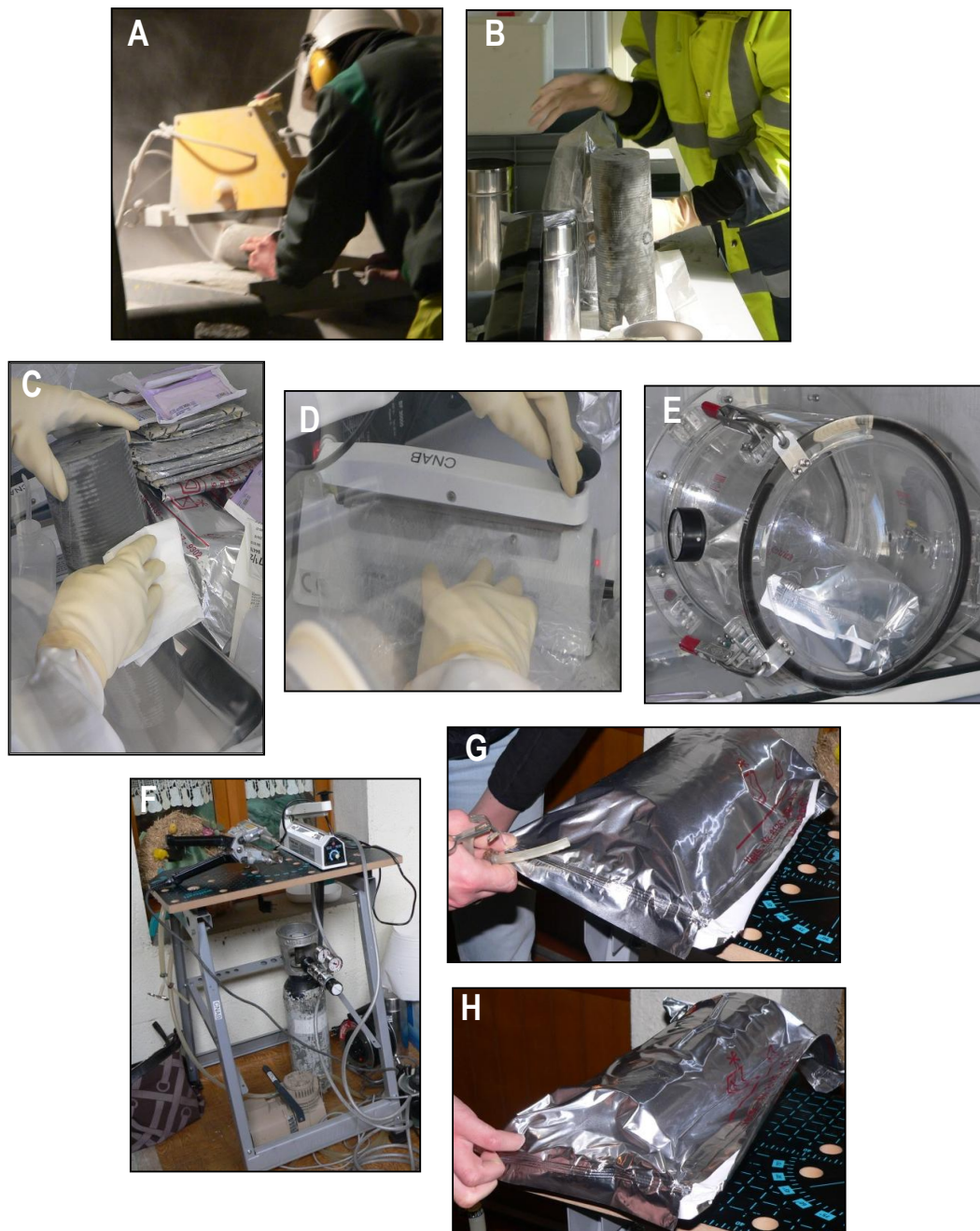


Figure 21. Procédure de pré-conditionnement des carottes issues du forage EST433. (A), découpe de passe K1-17. (B), transfert d'un échantillon en sac stérile. (C), décontamination à l'éthanol de la surface d'une carotte. (D), soudure du sac stérile en atmosphère inerte. (E), sortie d'un échantillon disposé dans une première enveloppe aluminisée de l'enceinte anaérobie. (F), poste de soudure. (G), mise sous azote de la première enveloppe aluminisée. (H), mise sous vide d'azote de la seconde enveloppe.

Les boues de forage ont également été fractionnées dans l'enceinte anaérobie. La moitié du volume de chaque boue récupérée a été transférée dans une bouteille stérile bouchée et scellée sous azote. De plus, afin de répertorier les potentiels contaminants (ou bioaérosols) présents dans la BAG du laboratoire de l'ANDRA (Bure), un milieu nutritif (AEM1, pH 7) a été exposé à l'atmosphère anaérobie pendant la durée des premiers et des derniers conditionnements de la campagne de prélèvement.

Les portions « courtes » de carottes pré-conditionnées sous double enveloppe aluminisée sous azote (tableau 4) ont été stockées dans une enceinte anaérobie pressurisée à 190 bars, à l'aide d'azote, le plus rapidement possible après leur prélèvement dans le but de conserver la potentielle communauté microbienne piézophile présente dans les roches.

Tableau 4. Echantillons destinés à une conservation sous pression.

Dates de		Numéros des passes	Référence des échantillons	Profondeur forées(m)	
prélèvement	pressurisation			de	à
23/05/08	27/05/08 ^(a)	K2-17	EST31387bis	1727,21	1727,30
01/06/08	06/06/08	K2-18	EST31572bis	1823,10	1823,19
02/06/08	06/06/08	K2-19	EST31603bis	1885,45	1885,54
04/06/08	06/06/08	K2-20	EST31467bis	1956,11	1956,20

(a) Echantillon ayant subi une dépressurisation le 05/06/08 pour permettre la mise sous pression des échantillons EST31572bis, EST31603bis et EST31467bis.

Ce système innovant de stockage (figure 22), construit sur mesure, supporte des pressions élevées (supérieures à 250 bars) ainsi qu'une large gamme de températures comprises entre - 20 et 120°C. La fermeture hermétique de cette enceinte a été effectuée à l'aide d'une clé dynamométrique en respectant les modalités de serrage spécifiées par le fabricant. Les goujons ont été serrés en croix à 2 daN.m afin de placer correctement le joint. Les écrous ont été ensuite vissés avec des couples de serrage successifs de 7, 14 et enfin 18 daN.m. La mise sous pression du système a été réalisée par paliers après vérification préalable de la tenue mécanique et de l'étanchéité de l'ensemble de l'appareillage (enceinte, raccords et manomètre).

Figure 22. Enceinte haute pression



A.1.3.2. Sous-échantillonnage en laboratoire

Les échantillons (fluides de forage et carottes de roche) ont été manipulés en enceinte anaérobie alimentée en azote ultra-pur ($O_2 < 2$ ppm, Alphagaz 1, Air liquide, France), à température ambiante. Des filtres stériles de $0,2 \mu m$ de diamètre de pores ont été placés sur le circuit de gaz en entrée d'enceinte afin d'éviter toute contamination bactérienne.

Le protocole de sous-échantillonnage décrit s'appuie sur celui établi par Poulain et al. (2008). Le sous-échantillonnage a été réalisé à l'aide de gants et d'outils stériles. Avant manipulation des carottes, la boîte à gants a été soigneusement décontaminée (Bactinyl, Inter Médical FOCSE, France puis éthanol 96%). La surface des échantillons a été entièrement brossée, puis décontaminée à l'éthanol absolu. Enfin, les tranches internes d'intérêt ont été extraites. La périphérie de chaque tranche a été supprimée sur environ 1 à 2 cm d'épaisseur (figure 23), et les fragments issus du cœur des carottes ont été pulvérisés dans un mortier à l'aide d'un pilon. Afin de s'affranchir de l'hétérogénéité spatiale des microorganismes séquestrés dans les roches, un important volume de poudre a été constitué (de l'ordre de 200-300 mL). La totalité du volume a ensuite été brassée dans une bouteille stérile bouchée et enfin répartie dans plusieurs flacons stériles bouchés, scellés sous azote (figure 23). La poudre de roche destinée à l'approche culturale a été conservée à $4^\circ C$ alors que celle utilisée pour l'approche moléculaire a été congelée à $-20^\circ C$.

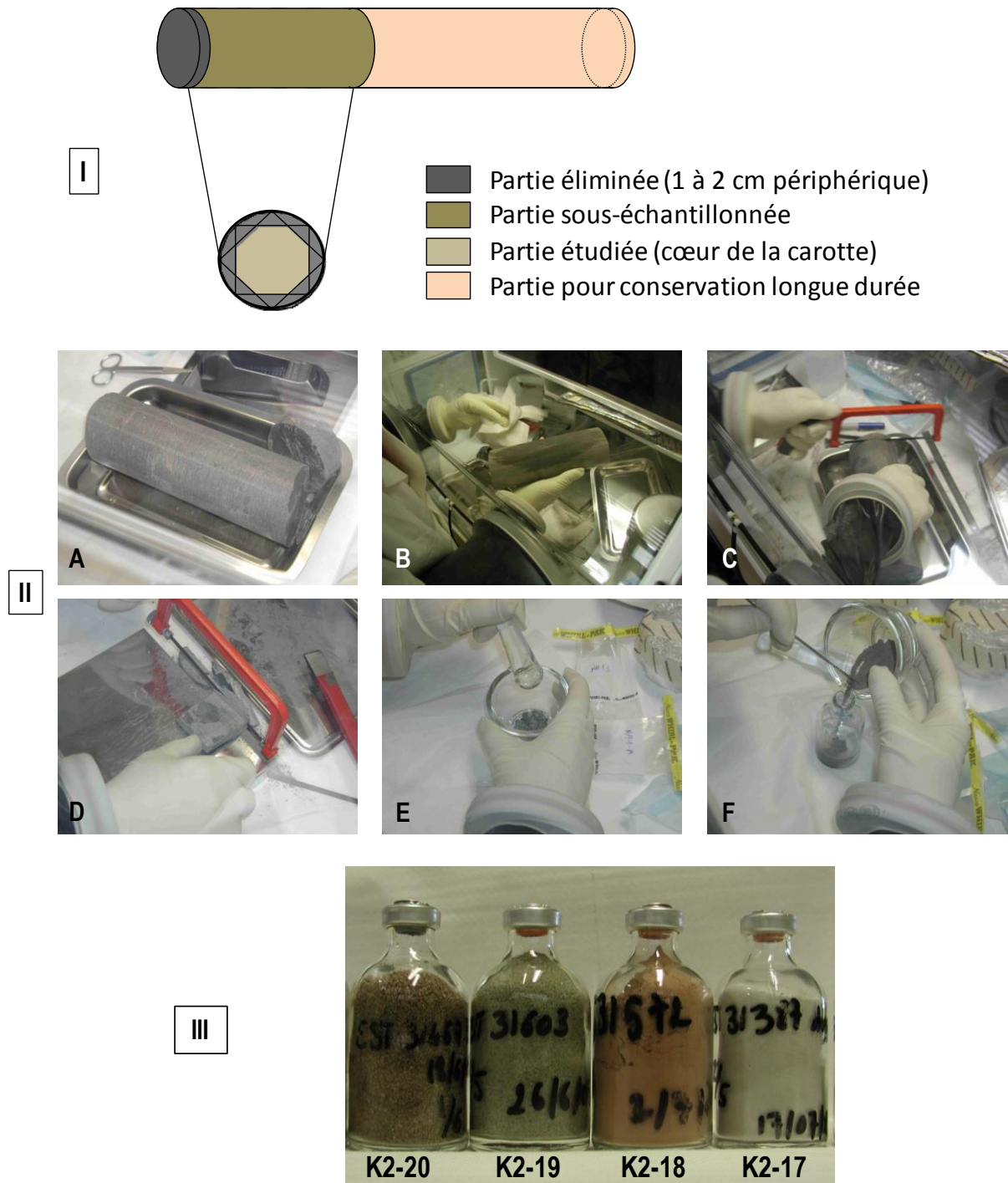


Figure 23. Procédure de sous-échantillonnage des carottes de roche en laboratoire (dans une boîte à gants sous atmosphère N_2). I : Représentation schématique du sous-échantillonnage d'une carotte. II : Protocole appliqué. (A), carotte avant découpe sur plateau stérile (B), nettoyage de la surface à l'éthanol (C), découpe de tranches internes (D), élimination de la périphérie et récupération du cœur des carottes (E et F), broyage. III : Echantillons du Trias réduits en poudre et conditionnés en flacons stériles sous azote présentés selon leur ordre stratigraphique du plus ancien au plus récent (de gauche à droite).

La majorité des carottes conservées à pression atmosphérique a été sous-échantillonnée dans les 2 mois suivant leur prélèvement. Les échantillons de roche conservés sous pression ont été stockés pendant 18 mois avant d'être sous-échantillonnés (tableau 5).

Tableau 5. Durée de la période de stockage des carottes de roches avant leur sous échantillonnage en laboratoire et temps nécessaire à la réalisation du conditionnement sous forme de poudre.

Numéros des passes	Référence des échantillons	Période de stockage avant sous-échantillonnage				Temps de réalisation (jours)
		inférieure à 30 jours	comprise entre 30 à 60 jours	environ 9 mois	18 mois	
K2-17	EST31387		✓			3 à 4
	EST31387bis				✓	
K2-18	EST31571		✓			2 à 3
	EST31572		✓			
	EST31572bis				✓	
K2-19	EST31602			✓		1
	EST31603	✓				
	EST31603bis				✓	
K2-20	EST31465		✓			1
	EST31467	✓				
	EST31467bis				✓	

Concernant les fluides de forage, deux boues composites ont été confectionnées en distinguant les boues à base d'huile et celles à base d'eau. Pour chaque nature de fluide, 30 à 40 mL des différentes boues collectées ont été transférés dans une même bouteille stérile fermée sous azote à l'aide d'un septum en caoutchouc et d'un bouchon à vis. Tous les fluides de forage ont été conservés à 4°C.

A.2. Approches culturelles

Divers enrichissements aérobies et anaérobies ont été testés dans le but de déterminer si des microorganismes pouvaient se développer à partir des roches sédimentaires du Trias et des fluides de forage associés. La composition des différents milieux et leurs valeurs de pH sont décrites en annexe 3.

L'élaboration des milieux anaérobies a nécessité l'élimination de l'oxygène présent et le maintien de l'anoxie durant les étapes d'amendement, d'inoculation et d'incubation. De manière générale, l'anaérobiose des milieux a été obtenue en ajoutant 100mL d'eau distillée (volume minimum) aux milieux préparés et dont les pH avaient été préalablement ajustés aux valeurs désirées à l'aide de KOH 10 M (la valeur du pH étant fonction du milieu considéré) ; les mélanges ont ensuite été portés à ébullition sous flux d'azote. Une fois dégazés et revenus à leurs volumes initiaux, les milieux ont été refroidis et répartis à température ambiante, toujours sous flux d'azote, dans des tubes Hungate ou des flacons serum de 60 mL bouchés et scellés selon la technique de Miller et Wolin (1974). Tous les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage entre 20 et 40 minutes à 121°C. Avant inoculation, les milieux d'enrichissement anaérobies stériles ont été amendés en source d'énergie et en accepteurs d'électrons, en $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (réducteur), en NaHCO_3 et parfois en vitamines à partir de solutions stock anoxiques et stériles.

A.2.1. Enrichissements à partir des matrices gréseuses profondes

Dans le but d'identifier et d'isoler les microorganismes cultivables présents au sein des compartiments géologiques profonds du Trias, une vaste approche culturale a été entreprise. Les environnements terrestres profonds sont communément considérés comme des écosystèmes anoxiques où la fermentation, la réduction des composés soufrés et la méthanogénèse sont les métabolismes microbiens les plus fréquemment rencontrés. Par conséquent, l'approche culturale réalisée pour les quatre roches sédimentaires originaires du Trias s'est essentiellement articulée autour de trois guildes métaboliques : les méthanogènes, les BSR et les fermentaires. Néanmoins, la présence de microorganismes aérobies, nitrato-réducteurs, thiosulfato-réducteurs ou encore de chimolithotrophes capables de réduire d'autres accepteurs d'électrons inorganiques, tel que l'AQDS, a également été recherchée. Le tableau 6 résume les métabolismes microbiens ciblés et les associe aux différents milieux d'enrichissement utilisés au cours de cette étude. Chaque milieu d'enrichissement testé a été décliné sous différentes salinités, à l'exception du milieu DSM 372 ciblant spécifiquement les microorganismes halophiles extrêmes. A l'exception des milieux d'enrichissement IRD qui ont été uniquement utilisés pour les échantillons K2-18 et K2-20, tous les autres milieux ont servi à la mise en culture des quatre roches profondes du Trias. Les tentatives d'enrichissement ont été réalisées, pour la grande majorité, à proximité de la neutralité dans une gamme de pH comprise entre 6,5 et 7,5. Quelques essais ont également été tentés à pH 8 (IRD 1, 2, 3, 4 et 5).

Tableau 6. Métabolismes microbiens ciblés dans l'étude de la biosphère cultivable contenue dans les roches gréseuses du Trias.

	Guides métaboliques	Accepteurs d'électrons	Sources d'énergie	Milieux d'enrichissement ²
Aérobies	Chimiohétérotrophes	O ₂	Glucose, extrait de levure, peptone, TSB	AEM1, AE, TSB
Anaérobies	Fermentaires (Chimiohétérotrophes)	[CH ₂ O] _n	Glucose, fructose, extrait de levure, peptone, Casamino-acides, Na-glutamate	ANM1, F1, F2, EP, SS, DSM 372
	Bactéries nitrato-réductrices	NO ₃ ⁻	Glucose	IRD1
	Bactéries thiosulfato-réductrices	S ₂ O ₃ ²⁻	Lactate, H ₂	IRD2, IRD3
	Procaryotes Sulfatoréducteurs	SO ₄ ²⁻	Lactate, pyruvate, H ₂	ANM5, L, B, HL
	Méthylotrophes	CH ₄	Méthanol, tri-méthylamine	M, C, IRD4
	Méthanogènes	CO ₂	Acétate, H ₂	HM, AMN4, IRD5
	Autres lithotrophes	AQDS ¹	H ₂	AMN3

¹AQDS : composé analogue des substances humiques (Lovley et al., 1996).

² Compositions des milieux décrites en annexe 3.

Les milieux ont été inoculés à 10% m/v avec un échantillon de roche pulvérisé sous l'atmosphère inerte (N₂) de la BAG préalablement décontaminée. Deux catégories distinctes d'inocula ont été définies : les roches triasiques conservées à pression atmosphérique et celles conservées sous haute pression (190 bars).

Les incubations réalisées à pression atmosphérique ont ciblé trois types de microorganismes en fonction de la température appliquée : les mésophiles (30 et 37°C), les thermo-tolérants (50 et 55°C) et les thermophiles (70°C). Le tableau 7 récapitule les salinités testées, le mode de conservation des échantillons inoculés et les paramètres d'incubation (température, pression et durée) employés pour chaque milieu de culture. Les incubations sous pression (150 bars) ont été réalisées à 55°C et la teneur

en NaCl a été définie en fonction de l'échantillon de roche considéré dans le but de reproduire les conditions physicochimiques régnant *in-situ*. De plus, deux eaux synthétiques (EP), représentatives de la composition chimique des eaux contenues dans les pores des échantillons K2-17 et K2-18, ont été élaborées d'après les équilibres ioniques eau/roches (lixiviats), la minéralogie des roches et leur observation en lames minces (modélisation PhreeqC¹⁶).

Tableau 7. Récapitulatif des teneurs en NaCl testées, du mode de conservation des inocula et paramètres d'incubation en fonction des milieux d'enrichissement utilisés.

Milieux utilisés	Salinités testées (g.L ⁻¹ de NaCl)	pression de conservation des échantillons inoculés	Conditions d'incubation		
			Températures (°C)	Pression (bars)	Durée (mois)
IRD1, 2, 3, 4 et 5 ^(a)	2, 5, 10, 50 et 200	atmosphérique	37, 50 et 70	1,0	>12
AEM1, TSB,	0, 1, 10 et 100	atmosphérique	30 et 55	1,0	>9
ANM1, 3, 4 et 5	0, 1, 10, 50, 100	atmosphérique	30, 55 et 70	1,0	>12
DSM 372	200	atmosphérique	55 et 70	1,0	>12
AE, F1, SS, L, HL, M et HM	13 et 130 ^(b)	atmosphérique	30 et 55	1,0	>9
F2, B, C SS et EP	Salinité fonction de l'échantillon ^(c)	atmosphérique et haute pression	55	1,0 et 150 bars	2 et 4

^(a) enrichissements réalisés uniquement pour les échantillons K2-18 et K2-20 en collaboration avec l'équipe du laboratoire des environnements chauds de l'IRD de Marseille

^(b) utilisation de sels de mer reconstitués (Sigma)

^(c) 80 g.L⁻¹ de NaCl pour les milieux d'enrichissements destiné à K2-17, 200 g.L⁻¹ dans ceux de K2-18 et 100 g.L⁻¹ pour ceux destinés à K2-19 et K2-20.

Divers témoins de culture ont été réalisés. Tout d'abord, des milieux amendés non inoculés ont été incubés dans les mêmes conditions de températures à titre de témoins négatifs pour les incubations à pression atmosphérique uniquement. Des milieux ont étéensemencés avec des matrices

¹⁶ PhreeqC : http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/GWC_coupled/phreeqc/

environnementales tyndalisées¹⁷ selon les mêmes procédures décrites précédemment dans le but d'observer les potentielles modifications abiotiques des échantillons naturels, induites par les conditions de culture, pouvant être assimilées à de faux positifs de croissances. Enfin, des témoins positifs ont été réalisés en inoculant, au 1/100, des souches microbiennes caractéristiques des environnements de subsurface (*Thermosipho japonicus*, *Petrotoga mexicana* et *Desulfovibrio profundus*) dans les milieux préconisés par DSMZ (respectivement 283, 718 et 383) en présence de 10% m/v d'inoculum de roche afin de s'assurer que la roche ne contenait pas de substances pouvant inhiber la croissance microbienne. Chaque souche a été incubée avec chacune des quatre roches.

A.2.2. Communauté microbienne des fluides de forage et bioaérosols

Dans ce volet de l'approche culturale, un inventaire du « fond » de la communauté microbienne cultivable et potentiellement contaminante a été mené. Nous nous sommes intéressés aux microorganismes contenus dans les boues de forage et les microorganismes aéroportés présents dans l'enceinte de la BAG ou bioaérosols.

Les fluides de forage

Quatre milieux de culture ont été sélectionnés pour dénombrer et caractériser la communauté microbienne contenue dans les deux lots de fluides synthétiques de forage (boues à l'huile et à l'eau). Ces milieux sont classés en deux groupes : les milieux de pH neutre (pH 7 ; AEM1 et ANM1) et les milieux alcalins (pH 11,5 ; AANM1 et AAEM1). Le pH des milieux alcalins a été défini en fonction des valeurs de pH des boues composites à l'eau et à l'huile respectivement de 11 et de 12 unités pH. Chaque catégorie de milieux a été préparée en conditions oxygène et anoxique afin de d'estimer les communautés microbiennes mésophiles :

- Aérobies hétérotrophes neutrophiles (AEM1) et alcalinophiles (AAEM1),
- Fermentaires neutrophiles (ANM1) et alcalinophiles (AANM1).

Le dénombrement des micro-organismes a été réalisé par dilutions de 10 en 10 des boues de forage directement dans les milieux liquides choisis pour l'étude. Une dilution au 1/2 a été ajoutée à chaque série de dilution dans le cas où l'on rencontrerait une communauté restreinte. La procédure a été répétée trois fois. Pour chaque dilution, un volume de 100 µL a été prélevé et étalé sur le milieu gélosé correspondant (contenant 1,5% m/v d'agar-agar ; Eurobio). Les étalements sur milieux

¹⁷ Tyndalisation : procédé de stérilisation modérée qui permet d'éliminer du milieu les formes de résistance des bactéries.

anoxiques ont été réalisés en enceinte anaérobie. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 7 jours en aérobiose et pendant 4 semaines en anaérobiose avant dénombrement. Les colonies apparues ont été isolées en milieu solide puis ensemencées en milieu liquide dont la composition était identique à celle ayant favorisé leur développement initial.

Les bioaérosols

Les milieux AEM1 gélosés exposés à l'atmosphère de l'enceinte anaérobie, lors de l'étape de pré-conditionnement des échantillons sur site (tableau 8), ont été incubés durant 7 jours à 30°C puis conservés à 4°C pour limiter la croissance fongique et bactérienne. Pour chaque morphotype observé, une à trois colonies ont été prélevées et ensemencées sur milieu gélosé jusqu'à obtention de cultures pures.

Tableau 8. Conditions d'exposition des boîtes de Pétri lors de l'étape de pré-conditionnement sur site.

Boîtes	Dates d'exposition	Lieu d'exposition	Conditions d'exposition
A	01/06/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
B	01/06/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
C	06/06/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
D	06/06/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
E	17/04/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
F	17/04/2008	BAG, ANDRA	Sous N ₂
G	17/04/2008	BAG, Couvertpuis	Sous N ₂ à -3°C

A.3. Ecologie moléculaire

A.3.1. Extraction d'ADN

Des extractions d'ADN ont été menées sur le cœur des carottes de roches sédimentaires pulvérisées, sous leurs formes « sèches » et incubées (milieux d'enrichissement), sur les deux catégories de boues de forage et sur les isolats microbiens cultivés afin de les identifier.

A.3.1.1. Protocoles d'extraction d'ADN testés sur les roches sédimentaires du Trias

Plusieurs protocoles d'extraction d'ADN ont été appliqués sur les matrices sèches des quatre roches profondes du Trias. Pour certaines méthodes, des essais d'optimisation ont été réalisés à partir

d'échantillons issus de la périphérie de la roche K2-20 uniquement et les plus adaptés ont été reproduits sur le cœur des quatre roches, supposé exempt de contaminations. Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C dans des microtubes ayant une faible affinité pour les molécules d'ADN (DNA lobind microtube, Eppendorf).

Les extractions d'ADN sur matrices incubées ont été réalisées à partir des culots obtenus après centrifugation des milieux d'enrichissement à $6000 \times g$ pendant 5 minutes.

Des extractions d'ADN, sans incorporation de matrice environnementale, ont été réalisées en parallèle de chaque protocole afin de produire des témoins négatifs d'extraction. Le tableau 9 liste les méthodes d'extraction et les essais d'optimisation testés au cours de cette étude, les catégories d'échantillons extraits par les différentes techniques ainsi que le mode de purification appliqué aux extraits d'ADN environnementaux (cf. paragraphe A.4.2.).

Tableau 9. Protocoles d'extraction d'ADN utilisés sur les différents échantillons du Trias.

Référence des protocoles d'extraction d'ADN	Durée de l'extraction	Essais d'optimisation ^(a)	Matrices sèches conservées		Matrices incubées	Purification ^(b)	
			à pression atmosphérique	sous haute pression		Dialyse	Colonne Geneclean
Néble et al. (soumis) (Protocole 1)	3 jours	Aucun ajout de lait UHT demi écrémé Diminution du temps de désorption Ajout de poly dIdC	✓				✓
Tsai et Olson (1991) (Protocole 2)	2 jours	Désorption préalable des cellules Lavage préalable des échantillons Ajout de poly dIdC	✓			✓	
FastDNA Spin Kit for Soil (Protocole 3)	30 minutes	Ajout de poly dIdC Absence de la matrice de lyse	✓	✓	✓	✓	
UltraClean Mega Soil DNA Kit (Protocole 4)	60 minutes		✓	✓		✓	

^(a) Réalisés uniquement à partir de la périphérie de la carotte K2-20 (matrice « sèche »)

^(b) Réalisées uniquement pour les extraits d'ADN obtenus à partir des matrices sèches

Protocole 1 : Extraction d'ADN de cellules microbiennes décrochées en présence de leur matrice environnementale d'origine

Un protocole d'extraction d'ADN, initialement développé à partir d'argile à Opalinus du Mont Terri (Nèble et al., soumis), a été utilisé pour les échantillons naturels du Trias. Ce protocole combine un traitement physique et chimique des matrices environnementales.

Dans un premier temps, les échantillons (5 g) sont incubés sous agitation (160 rpm) pendant 5 jours à 25°C dans 15 mL de tampon de désorption ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 H_2O 7,5 mM [pH 8,00], Tween 80 à 0,5 g.L⁻¹ final ; Böckelmann et al., 2003). Avant l'étape de lyse, un volume de 5 mL de lait UHT demi-écrémé du commerce est ajouté à la boue obtenue après désorption et l'ensemble est vigoureusement agité. Le tampon de lyse (NaCl 200 mM, Tris 200mM, $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$, 3 H_2O 2 mM, CaCl_2 10 mM, Na_2EDTA , 2 H_2O 50 mM, SDS 2% final [pH 8,00] ; Zhang et al., 2005) est ensuite ajouté (10 mL) et le mélange réactionnel est soumis à 5 sonications successives de 1 minute, dans un bain à ultrasons préalablement dégazé pendant 10 minutes, entrecoupées de période d'incubation de 1 minute à – 20°C. Après une incubation à 70°C pendant 30 minutes et une centrifugation à 10000 x g pendant 10 minutes, le surnageant est prélevé. Deux volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 sont délicatement mélangés à la solution et le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C avant d'être centrifugé à 13000 x g pendant 20 minutes. Le culot obtenu est remis en suspension dans 1 à 3 mL d'eau stérile auquel est additionné 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2. Le mélange réactionnel est incubé 10 minutes à 4°C puis centrifugé 5 minutes à 10000 x g. Enfin seul le surnageant est conservé. Un volume identique de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (PCI) (25 :24 :1) est ajouté au volume de surnageant. Une émulsion est obtenue par une brève agitation vigoureuse et le mélange est centrifugé à 13000 x g pendant 10 minutes. La phase aqueuse du mélange subit un traitement au Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1). Le mélange est de nouveau émulsionné et centrifugé (13000 x g, 10 minutes). L'ADN environnemental est précipité à partir de la phase aqueuse à l'aide de 0,6 volume d'isopropanol froid. Le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C, centrifugé à 13000 x g pendant 30 minutes, lavé à l'éthanol glacé 70%, séché à l'étuve et repris dans 50 µL d'eau stérile.

Des extractions d'ADN ont également été réalisées en modifiant ce protocole : aucun ajout de lait UHT demi-écrémé, diminution du temps de désorption et ajout de poly dIdC, ADN synthétique masquant les sites d'adsorption de l'ADN contenus dans les matrices environnementales, et permettant ainsi une augmentation du taux de récupération de l'ADN extrait (Barton et al., 2006).

Protocole 2 : Extraction directe d'ADN

Une méthode d'extraction d'ADN basée sur celles mises au point par Zhou et al. (1996) et Tsai et Olson (1991) ensuite modifiée par Lerner et al. (2006) a été menée sur les échantillons du Trias. Cette technique unit une lyse mécanique à l'action de molécules chimiques et enzymatiques.

Les échantillons de roche pulvérisée ont été lavés avant extraction dans un tampon phosphate 0,05 M contenant du CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) à 1% m/v (Lerner et al., 2006) (2 mL par g d'échantillon). Le CTAB est généralement utilisé pour l'élimination partielle des substances humiques et des polysaccharides dans les opérations d'extraction et de purification d'ADN sans perte d'ADN (Miller et al., 1999; Zhou et al., 1996). Le mélange est agité manuellement pendant 1 minute et centrifugé à 600 x g pendant 10 minutes. Les culots de roche lavées ont ensuite été mélangés à du tampon de lyse (Tris-HCl 200 mM, Na₂EDTA, 2H₂O 100 mM, NaCl 200 mM, Na citrate, 3H₂O 2 mM, pH 8,00 ; Tsai et Olson, 1991) contenant 10 mg de lysozyme.mL⁻¹ (Sigma) (2 mL de tampon de lyse par g d'échantillon). La boue obtenue subit une sonication dans un bain à ultra-son, préalablement dégazé pendant 10 minutes, à deux reprises pendant 4 minutes. Une phase de refroidissement de 4 minutes à 4°C est insérée à la fin de chaque cycle de sonication. Après une étape de lyse mécanique par agitation vigoureuse pendant 1 minute, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 2 heures avec une agitation toutes les 20 à 30 minutes. Trois cycles congélation (-20°C)/décongélation (65°C) sont conduits dans le but d'endommager les membranes des cellules microbiennes les plus résistantes. Un ajout de 0,1 volume de SDS 10% et de protéinase K (Sigma), à une concentration finale de 50 µg.mL⁻¹, est ensuite réalisé et l'ensemble est incubé à 65°C pendant 2 heures avec une agitation toutes les 20 à 30 minutes. Les lysats sont refroidis dans la glace avant l'ajout d'un volume de phénol tris saturé (pH 8). La suite du protocole est identique à celui mis au point par Tsai et Olson (1991). Une émulsion est obtenue par une brève agitation vigoureuse. Le mélange est centrifugé à 6000 x g pendant 10 minutes. La phase aqueuse du mélange subit un traitement PCI classique (25 :24 :1) (Sambrook et al., 1989) avec des conditions de centrifugations identiques. Finalement, les acides nucléiques extraits dans la phase aqueuse sont précipités avec 0,6 volume d'isopropanol froid pendant une nuit. Un culot d'acides nucléiques brut est obtenu par centrifugation à 10000 x g pendant 10 minutes, lavé à l'éthanol glacé 70%, séché à l'étuve et remis en suspension dans 500µL d'eau stérile ou de tampon TE (tampon Tris 10 mM [pH 8,00], Na₂EDTA, 2H₂O 1mM).

Dans le but d'augmenter les rendements d'extraction d'ADN environnementaux et d'améliorer la biodiversité extraite, des essais d'optimisation du protocole décrit ci-dessus ont été menés.

- (i) La procédure d'extraction décrite précédemment a été réalisée sans l'étape de lavage préalable (Tsai et Olson, 1991).
- (ii) Basée sur le protocole de Nèble et al. (soumis), l'étape de lavage a été remplacée par une désorption des cellules microbiennes dans un tampon phosphate (pH 8,00).
- (iii) Afin de diminuer la probabilité d'adsorption des molécules d'ADN aux particules minérales, 100 µg de poly dIdC, molécules d'ADN synthétiques, ont été additionnés soit au tampon de lyse soit au tampon de désorption soit aux deux.

Protocole 3 : Extraction directe d'ADN à l'aide du kit commercial FastDNA Spin for Soil (Bio 101)

Cette technique rapide d'extraction directe d'ADN environnementaux est basée sur une lyse mécanique et chimique des cellules microbiennes.

Le protocole utilisé correspond à celui recommandé par le fabricant avec toutefois de légères modifications. Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de 0,5 mL d'échantillon naturel, volume correspondant à une masse comprise entre 500 et 800 mg. Une lyse homogène a été garantie par une agitation intense ($5,0 \text{ m.s}^{-1}$ pendant 30 secondes) avec le Fast Prep instrument (Hybriid ribolyser, Bio101). Les durées des premières centrifugations ont été augmentées à 25 minutes pour l'élimination des débris cellulaires et à 15 minutes pour oter les protéines présentes dans le lysat. L'ADN environnemental extrait a ensuite été purifié par la procédure GENECLAN®. Cette méthode allie les propriétés d'adsorption de l'ADN sur la matrice de silice et l'utilisation de guanidine thiocyanate qui élimine les substances humiques inhibitrices des réactions d'amplifications. De plus, une étape optionnelle, préconisée par le fabricant, a été ajoutée dans le but d'augmenter le taux de récupération de l'ADN extrait. Avant élution de l'ADN, la matrice de silice, re-suspendue dans 100 µL de solution DES, a été incubée à 55°C pendant 5 minutes.

Les extractions d'ADN à partir des matrices environnementales « sèches » ont été répétées 5 à 8 fois et tous les extraits ont été mélangés afin d'obtenir un ADN extrait moyen correspondant à une masse d'échantillon de départ de l'ordre de 5 g.

Des essais d'optimisation d'extraction ont été tentés à partir du protocole énoncé ci-dessus.

- (i) Afin de masquer les sites de fixation non spécifiques de l'ADN présents dans les échantillons naturels, une quantité de 5 µg de poly dIdC a été introduite lors de l'ajout du tampon de phosphate de sodium pendant la première étape du protocole décrit par le fabricant.

- (ii) Dans le but de diminuer les frictions mécaniques pouvant induire une fragmentation de l'ADN, des essais d'extraction ont été réalisés en utilisant uniquement la taille des particules minérales (granulométrie) des échantillons pulvérisés des grès du Trias comme matrice de lyse en présence ou non de poly dIdC.

Protocole 4 : Extraction directe d'ADN à l'aide du kit commercial UltraClean Mega Soil DNA (MoBio)

Le principe de la procédure d'extraction d'ADN de ce kit commercial est similaire à celui décrit précédemment, *i.e.* que l'extraction d'ADN environnemental est rendue possible grâce à l'association d'une lyse mécanique et d'un traitement chimique. Contrairement au kit FastDNA Spin for Soil (Bio 101), le kit UltraClean Mega Soil DNA (MoBio) permet d'extraire de l'ADN à partir d'une quantité plus importante d'échantillon en une seule fois (jusqu'à 10 g pour le kit Mobio face à 0,8 g maximum pour le kit Bio 101).

Les ADN microbiens séquestrés dans les différentes matrices sèches du Trias ont été extraits en utilisant le protocole recommandé par le fabricant. Les extractions ont été réalisées sur environ 5 g d'échantillons. Les extraits d'ADN génomiques étant élués dans un volume final de 8 mL, les extraits ont été immédiatement concentrés selon les indications du fabricant. Enfin, les extraits d'ADN ont été repris dans 900 µL de tampon TE stérile.

A.3.1.2. Pré-traitement des boues de forage et extraction d'ADN

Les boues à l'huile

Seules les boues à l'huile correspondant au début et à la fin du carottage du premier échantillon du Trias (K2-17) ont été traitées. A cause de leur importante contamination au gazole (annexe 2), les cutting¹⁸ contenus dans les boues à l'huile ont subi trois lavages successifs avec trois tampons distincts (Fortin et al., 2004) dans le but d'éliminer les hydrocarbures et les substances inhibitrices des réactions PCR. Le premier et le troisième lavage ont été répétés deux fois. Le kit UltraClean Mega Soil DNA (MoBio) a été utilisé, selon les recommandations du fabricant, sur 5 g de cuttings préalablement lavés.

¹⁸ Cutting : copeaux de roche remontés à la surface grâce à la circulation des boues de forage

Les boues à l'eau

Les fractions liquides des boues à l'eau avant carottage ont été réunies dans un flacon stérile. Différents filtres en nitrocellulose ont été sélectionnés en fonction de leur diamètre de pores et stérilisés. Un volume d'environ 600 mL de cette « eau » a ensuite subi une filtration différentielle afin de s'affranchir des particules grossières en suspension (3 et 0,8 μm). Le filtrat a été centrifugé 20 minutes à 14000 x g. Le protocole 3 d'extraction direct d'ADN (cf paragraphe A.4.1.1.) a été appliqué sur le culot préalablement lavé avec 1 mL de tampon phosphate de sodium (pH 8) fourni avec le kit FastDNA Spin for Soil (Bio 101). Trois lavages ont été nécessaires pour diminuer le pH initial (de l'ordre de 11) à une valeur plus proche de la neutralité, recommandée pour l'étape d'extraction d'ADN (pH 8 – 9).

A.3.1.3. Extraction d'ADN à partir de cellules bactériennes

L'ADN génomique de chaque isolat originaire des fluides de forage et des bioaérosols a été extrait à l'aide du kit FastDNA® Spin (Bio101) selon le protocole établi par le fabricant. Le principe et le protocole de ce kit sont similaires à ceux décrits pour le kit FastDNA Spin for Soil. La procédure d'extraction a été réalisée sur les culots bactériens obtenus après centrifugation des milieux de culture liquides (4 à 10 mL) à 14000 x g pendant 5 minutes.

A.3.2. Purification des extraits d'ADN environnementaux

Pour le protocole 1 d'extraction d'ADN, les auteurs ont recommandé de purifier les extraits sur colonne avec le kit Geneclean Turbo (MP Biomedicals) selon les indications du fabricant.

Les ADN environnementaux extraits (i) selon les procédures d'extraction 2, 3 et 4 (cf paragraphe A.4.1.1.) à partir du cœur des échantillons de roche du Trias sous forme de matrices « sèches » et (ii) des cutting des boues de forage (cf paragraphe A.4.1.2.) ont été purifiés par dialyse. Chaque extrait d'ADN est placé dans une unité de dialyse (Slide A Lyser Mini Dialysis Unit, 3.5k MWCO) et dialysé contre 400 mL de tampon TE à 4°C pendant 24 heures. Le tampon de dialyse est renouvelé une fois (8 à 12 heures après le début de la procédure). Les extraits d'ADN sont ensuite concentrés par précipitation pendant une nuit à 4°C avec 0,6 volume d'isopropanol froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 suivi d'une centrifugation à 13000 x g pendant 30 minutes. Les culots d'ADN sont lavés dans de l'éthanol glacé à 70%, séchés par évaporation (concentrator 5301, Eppendorf) et re-suspendus dans de l'eau stérile (1/10 du volume initial).

A.3.3. Amplification par PCR du gène codant l'ARN ribosomique 16S

Les portions de gène codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées par PCR à partir d'1 à 2 µL d'ADN cible dans un mélange réactionnel contenant (en concentrations finales) 1X de tampon PCR GoTaq® Flexi (Promega), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 25 µM de chaque dNTP, 500 nM de chaque amorce sens et anti sens, 0,05 U de GoTaq polymérase (Promega) par µL et de l'eau stérile qualité biologie moléculaire (qsp 20 µL). Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycler iCycler de Biorad selon un programme d'amplification type détaillé dans le tableau 10. Les amorces utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 10. Programme PCR type.

Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale ⁽¹⁾	95°C	2 minutes	1
Dénaturation	95°C	30 s	10 – 40
Hybridation	50 - 65 °C (selon le couple d'amorces utilisé)	30 s	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Elongation finale	72°C	10 minutes	1
Maintien	15°C	∞	

⁽¹⁾ Pour la PCR sur colonie : 96°C pendant 10 minutes

Tableau 11. Séquences et sources des amorces.

Amorces	Séquences (5' 3') ⁽¹⁾	Positions sur <i>E. coli</i> ⁽²⁾	Références
<i>Bacteria</i>			
w49	ACG GTC CAG ACT CCT ACG GG	F 329-348	(Delbès et al., 1998)
w34FAM ⁽³⁾	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	R 515-533	(Zumstein et al., 2000)
Fd1deg	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	F 8-27	(Weisburg et al., 1991)
1492R	TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC	R 1492-1511	(Lane, 1991)
1406R	GAC GGG CGG TGT GTR CA	R 1406-1422	(Lane et al., 1985)
341F ⁽⁴⁾	CCT ACG GGA GGC AGC AG	F 341-357	(Muyzer et al., 1993)
907rc	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	R 907-926	(Muyzer et al., 1996)
<i>Archaea</i>			
Arc20F	TTC CGG TTG ATC CYG CCR G	F 20-38	(Orphan et al., 2000)
Arc109F	ACK GCT CAG TAA CAC GT	F 109-125	(Grosskopf et al., 1998)
Arc344F	ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA	F 344-363	(Baker et al., 2003b)
Arc915R	GTC CTC CCC CGC CAA TTC CT	R 915-934	(Wang et al., 2005)
<i>Plasmides</i>			
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	-	-
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	-	-
SP6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G	-	-

⁽¹⁾ D = G, A ou T; H = A, T ou C; K = G ou T; M = A ou C; R = A ou G; S = G ou C; W = A ou T; Y = C ou T.

⁽²⁾ D'après l'annotation du génome par Brosius et al. (1981), F et R correspondent respectivement aux amorces sens (forward) et anti-sens (reverse)

⁽³⁾ Amorce W34 marquée à la phosphoramidite fluorescéine à son extrémité 5'

⁽⁴⁾ Amorce utilisée en DGGE avec la queue GC de Muyzer (1993) : CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G

Dans ce travail, la communauté bactérienne totale a été recherchée par amplification des gènes codant l'ARNr 16S du domaine *Bacteria* et *Archaea*. Les domaines d'application des différents couples d'amorces sont résumés dans le tableau 12. Il est à noter que des PCR nichées ont été réalisées à partir de 1µL de produits d'amplification dilués au 1/10. De plus, afin de rechercher les inserts de taille attendue après un clonage, les bibliothèques de gènes ont été criblées par PCR sur colonies à l'aide d'amorces ciblant le vecteur de clonage de part et d'autre de l'insert.

Tableau 12. Domaines d'application des couples d'amorces utilisés dans cette étude

Couple d'amorce	Application	Taille du fragment (pb)	T _m (C°)	Nature de l'ADN cible
Fd1deg/1492R Fd1deg/1406R	Recherche de la communauté bactérienne totale	~ 1400-1500	55	Extraits d'ADN environnementaux
Arc20F/Arc915R Arc109F/Arc915R Arc344F/Arc915R	Recherche de la communauté archéenne totale	~ 900 ~ 800 ~ 550	65	Extraits d'ADN environnementaux
341F-GC/907R 341F/907R	Identification de la communauté bactérienne majoritaire par DGGE	~ 550 - 600	55	Produits d'amplification
Arc344F/w34FAM	Structure des communautés archéennes totales par CE-SSCP	~ 170	61	Produits d'amplification
w49/w34 FAM	Structure des communautés bactériennes totales par CE-SSCP	~ 200	61	Extraits d'ADN environnementaux
T3/T7 T7/SP6	Criblage des banques de clones	variable		ADN plasmidique

Afin de limiter l'amplification d'ADN contaminant lors des réactions de PCR, les mélanges réactionnels ont été réalisés sous une hotte aspirante de confinement (Biocap) munie d'une lampe à rayonnements ultraviolets. Avant chaque utilisation, le matériel plastique ainsi que les lots d'eau stérile ont été irradiés sous 5000 μ J d'U.V pendant une heure dans un four à hybridation (HL-2000 hybrilinker, UVP laboratory product). De plus, sous la hotte, la surface de travail a été nettoyée à l'alcool et les divers consommables et pipettes servant à l'élaboration des mélanges réactionnels ont été exposés aux U.V pendant 15 minutes dans le but d'éliminer les traces d'ADN résiduels pouvant générer de faux positifs. Un témoin négatif exempt d'ADN a systématiquement été inclus dans chaque série de réactions pour garantir la stérilité des différents réactifs utilisés. L'ADN est ajouté au mélange réactionnel à l'extérieur de la hotte Biocap.

Un aliquot (4 μ L) de chaque réaction d'amplification a été analysé sur gel d'agarose 1 ou 2% m/v (selon la taille du fragment amplifié) en tampon TAE (Tris-HCl 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA

1mM à pH 8) 0,5X. Après migration électrophorétique (100 V pendant 30 minutes), les gels ont été colorés dans un bain de TAE 0,5X contenant du bromure d'éthidium (BET) pendant 15 minutes et visualisés par fluorescence aux U.V à l'aide de l'imageur GeneGenius et du logiciel GeneSnap (SynGene). Les produits d'amplification obtenus ont été quantifiés sur gel d'agarose à l'aide du logiciel GeneTools® (SynGene) en utilisant soit le marqueur de taille Smart Ladder® (Invitrogen) pour les produits PCR d'environ 1500 pb soit le SF Ladder® (Invitrogen) pour ceux inférieurs à 1500 bp.

A.3.4. *Analyse de la biodiversité moléculaire*

A.3.4.1. Structure des communautés microbiennes par CE-SSCP

La technique d'empreinte moléculaire CE-SSCP a été appliquée à la région V3 des gènes codant l'ARNr 16S, dans le but de comparer la biodiversité totale (bactérienne et archéenne) contenue dans des échantillons originaires du cœur et de la périphérie de la carotte K2-20. Cette technique a été également utilisée comme second crible pour discriminer rapidement les clones bactériens entre eux.

Principe

Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN simple brin, de taille identique, en fonction des conformations secondaires spécifiques qu'adoptent leurs séquences nucléotidiques en condition non dénaturante. Les fragments, amplifiés à l'aide d'une amorce marquée, sont préalablement dénaturés et introduits sous forme simple brin. Le brin marqué est alors détecté par un laser et visualisé sous forme de pic. Chaque pic de fluorescence correspond à une séquence unique de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S, donc à une souche bactérienne. La surface des pics est proportionnelle à la quantité d'ADN détectée.

Mode opératoire

Un volume de 1 µl de produit PCR amplifié à l'aide des couples d'amorces w49/w34 FAM et Arc344F/w34 FAM, dilué si nécessaire dans de l'eau (2 à 100 fois), a été ajouté à un mélange de formamide deionisée ultra pure (18,4 µL) et de standard interne (0,6 µL). Ce standard interne (Genescan-600 LIZ, Applied Biosystems) permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration propre à sa structure secondaire, donc à sa séquence. Les ADN double brin ont été dénaturés par chauffage (5 minutes à 95 °C), puis refroidis rapidement (15 minutes dans de la glace)

afin de s'assurer d'une dénaturation irréversible. Une électrophorèse capillaire (12 kV, 32 °C, 32 minutes) a permis de séparer les fragments d'ADN simple brin à travers un polymère non dénaturant dilué à 5,6% (CAP polymer, Applied Biosystems) dans un séquenceur ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Les profils de pics obtenus ont été analysés et alignés avec le logiciel GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

A.3.4.2. Composition de la communauté bactérienne majoritaire par DGGE

Dans ce travail, la technique DGGE a permis de comparer les profils de diversité obtenus à partir des quatre roches du Trias et ainsi d'obtenir une représentation de la distribution des communautés bactériennes détectées dans les différents compartiments géologiques du Trias traversés par le forage. Cet outil a également permis une identification directe des microorganismes détectés.

Principe

Cette technique repose sur la séparation de produits d'amplification de même longueur en fonction de leur séquence dans un gradient dénaturant linéaire vertical contenu dans un gel de polyacrylamide. Au cours de la migration, l'ADN déposé double brin, *i.e.* avec un encombrement stérique minimum, va se dissocier localement au niveau de domaines de fusion en fonction du gradient de dénaturation rencontré. Une migration différentielle des molécules d'ADN va alors s'opérer car leur dénaturation dépend de leur séquence nucléotidique. Pour prévenir une complète dissociation des deux brins d'ADN, une queue d'environ 40 nucléotides riche en GC est généralement attachée à l'extrémité 5' d'une des amorces.

Mode opératoire

Les produits d'amplification (PCR nichée, amorces GC-341F/907rc) ont été séparés sur gels polyacrylamide 6% contenant un gradient de dénaturation 35 – 65 à l'aide du système D-code (Biorad). Un gel polyacrylamide 6% type est composé du gradient de dénaturation, qui est le produit du mélange de deux solutions dénaturantes (35% et 65%) surmonté d'un « top gel » dont les compositions sont détaillées dans le tableau 13. Les gels de polyacrylamide ont été élaborés à partir de solutions mères 0% et 100% dénaturantes (soit 7 M d'urée et 40% de formamide).

Tableau 13. Compositions du gradient de dénaturation et du top gel constituant un gel DGGE

	Gradient de dénaturation		Top gel
	35%	65%	
Solution 0% ⁽¹⁾ (mL)	8,5	4,5	4
Solution 100% ⁽²⁾ (mL)	4,5	8,5	
APS 10% (μL)	60	60	40
Temed (μL)	7	7	4

⁽¹⁾ Pour 100 mL de solution dénaturante 0% : 15 mL de Solution d'acrylamide/bisacrylamide (37.5:1), 2 mL de TAE 50X, qsp 100mL d'eau déionisée.

⁽²⁾ Pour 100 mL de solution dénaturante 100% : 15 mL de Solution d'acrylamide/bisacrylamide (37.5:1), 2 mL de TAE 50X, 42g d'urée, 40 mL de formamide, qsp 100mL d'eau déionisée.

Une quantité d'ADN comprise entre 200 et 400 ng a été déposée dans chaque puits. La migration est réalisée dans 7 L de tampon TAE 1X à 20 V pendant 10 minutes, dans un premier temps pour que l'ADN pénètre dans le gel, puis à 80 V pendant 17 heures. La température du tampon d'électrophorèse est maintenue à 60°C tout au long de la migration. A l'issue de la migration, le gel est révélé pendant 20 minutes à l'obscurité dans un bain de TAE 1X contenant du BET pour une visualisation simple sous transilluminateur U.V ou du SYBR Gold pour une visualisation suivie d'une excision de bande DGGE sous lumière visible (Dark Reader DR-88M). La détection et la quantification de l'intensité relative des différentes bandes DGGE présentes ont été réalisées respectivement à l'aide des logiciels GeneTools (SynGene) et Quantity one® (Bio Rad). De plus, une matrice de données quantitatives basée sur l'intensité relative des bandes DGGE détectées sur chaque profil a été créée. Pour chaque protocole d'extraction, les bandes DGGE ont été considérées comme les variables et les différentes roches comme les individus. L'analyse statistique a été réalisée avec la version 2010.3.06 du logiciel Xlstat.

Les bandes d'intérêt ont été excisées du gel et placées dans des microtubes contenant 20 μl d'eau exempte de DNase. Après une incubation à 4°C pendant une nuit, 1 μl a ensuite été utilisé comme ADN cible afin de ré-amplifier par PCR les fragments à l'aide des mêmes amorces sans queue GC et selon des conditions PCR identiques à l'exception d'une augmentation du nombre de cycles (20 au lieu de 15).

A.3.5. Banque de clones et séquençage

Principe

Les banques de clones sont construites en utilisant la technique de clonage qui permet d'isoler et d'amplifier individuellement des fragments d'ADN cibles dans le but de les séquencer. Le clonage consiste à insérer un fragment d'ADN appelé insert dans un vecteur de clonage, généralement un plasmide possédant des gènes de résistance aux antibiotiques. Après transformation dans des cellules compétentes, les plasmides recombinants sont capables de se répliquer de façon autonome à l'aide de la machinerie cellulaire. Une sélection des cellules transformées est réalisée grâce à leur résistance aux antibiotiques. Ce criblage est suivi d'une individualisation des cellules transformées par mise en culture sur milieu solide. Chaque bactérie se multiplie et forme une colonie. Chaque colonie est composée de plusieurs milliers de cellules identiques ou clones.

Mode opératoire

Avant leur clonage, chaque fragment du gène codant l'ARNr 16S, amplifié avec le couple d'amorces Fd1deg/1492R a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, excisé et purifié à l'aide du kit Geneclean Turbo (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Après une estimation de la quantité d'ADN obtenue après purification (cf paragraphe A.4.3), une banque de clones a été construite à l'aide du kit TOPO® TA Cloning for Sequencing (Invitrogen). De plus, certaines bandes d'intérêt visualisées par DGGE ont été clonées dans les vecteurs pGEM®-T easy (Promega). Les inserts ont été amplifiés directement par PCR en sélectionnant aléatoirement un nombre variable de colonies (PCR sur colonie, cf paragraphe A.4.3) afin de sélectionner les clones possédant un insert de la taille attendue. Ces clones ont été criblés une seconde fois. Dans le cas des banques construites à partir de fragments de gène de longueur avoisinant les 1500 pb, les clones ont été classés selon leur migration en CE-SSCP (cf paragraphe A.4.4.1.). Les inserts obtenus à partir des bandes DGGE clonées ont été discriminés après migration électrophorétique en DGGE (cf paragraphe A.4.4.2.). Un clone représentatif de chacun des groupes ainsi définis et un clone issu de chaque bande DGGE clonée, ont été sélectionnés pour le séquençage. Après purification des ADN plasmidiques à l'aide des kits NucleoSpin® Multi-8 Plus Plasmid ou NucleoSpin® Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel) selon les protocoles indiqués par les fabricants, les inserts ont été séquencés par Genome Express (Grenoble, France) ou GATC (Marseille, France) avec des amorces spécifiques des vecteurs de clonage. Pour

certaines bandes DGGE, le séquençage a été réalisé avec l'amorce 341F directement sur les produits PCR issus de la ré-amplification directe des bandes DGGE excisées.

Le pourcentage de couverture des banque de clones (C) a été calculé par la méthode de Good (Good, 1953; Mullins et al., 1995) en utilisant l'équation :

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100$$

Où n_1 représente le nombre de clones n'apparaissant qu'une seule fois dans la banque de clones et N est le nombre total de clones examinés. Pour ces calculs, les clones présentant plus 97% de similarité de séquences ont été assimilés comme identiques.

Cette méthode permet de déterminer dans quelle mesure une banque de clones de petite taille est représentative de la population à partir de laquelle elle a été générée. Cette méthode donne une indication de la diversité initiale d'une population.

A.3.6. *Analyses phylogénétiques*

Les séquences d'ADN ont été comparées à celles disponibles dans les bases de données GenBank et Ribosomal Database Project. Les similarités de séquence avec les séquences références obtenues ont été recherchées à l'aide du programme BLASTn, disponibles sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. Les traitements et les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant le logiciel BioEdit (Hall, 1999). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel Treecon (Van de Peer et Wachter, 1994) selon la méthode du Neighbour Joining (méthode des distances ou NJ) basée sur le principe du minimum d'évolution (Saitou et Nei, 1987). Afin de corriger la sous-estimation du nombre d'évènements mutationnels induite par la méthode du NJ, la correction de Jukes et Cantor (Jukes et Cantor, 1969) a été appliquée. Ce modèle d'évolution suppose que toutes les substitutions ont une probabilité égale et que les transitions purine ↔ purine (A ↔ G), pyrimidine ↔ pyrimidine (C ↔ T) ; et les transversions purine ↔ pyrimidine ont le même poids. Enfin, la confiance dans la topologie des arbres inférés a été évaluée par des analyses de bootstrap sur 1000 répliques (Felsenstein, 1985).

B. ... Aux colonisateurs microbiens endogènes des environnements de subsurface

B.1. Souches microbiennes et paramètres de culture

Au cours de ce travail, huit souches microbiennes anaérobies ont été utilisées : 6 originaires d'écosystèmes profonds et 2 isolées à partir de biotopes hypersalés de surface (tableau 14). Ces 8 procaryotes ont été sélectionnés pour leur caractère halophile (croissances optimales en présence d'une concentration en sels proche voire supérieure à celle de l'eau de mer) et leur thermo-tolérance ou leur nature thermophile (avec des gammes de températures de croissance comprises entre 40 et 70°C). De plus, ces souches possèdent les métabolismes les plus fréquemment rencontrés dans les environnements de subsurface, *i.e.* la méthanogénèse, la réduction des composés soufrés (sulfato- et thiosulfato-réduction) et la fermentation. Deux représentants de chaque métabolisme ont été étudiés.

Tableau 14. Description des souches microbiennes utilisées

Souches (n°DSMZ ou OCM)	Métabolismes	Gamme de		Environnement d'origine	Références
		Température (optimum) (°C)	Salinité (optimum) (g.L ⁻¹)		
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> (DSM 2095)	Archée méthanogène/ Hydrogénotrophe	30 - 70°C (65)	13 - 83 (40)	Sédiment marin d'une aire volcanique active	(Huber et al., 1982)
<i>Methanohalobium evestigatum</i> (DSM 384)	Archée méthanogène/ Méthylotrophe	30 - 60 (50)	150 – 300 (250)	Sédiment de surface d'une lagune hypersalée	(Zhilina et Zavarzin, 1987)
<i>Desulfovibrio profundus</i> (DSM 11384)	BSR	15 - 65 (25)	2 – 100 (6 - 80)	Sédiment marin profond (518 m bsf)	(Bale et al., 1997)
<i>Desulfotomaculum geothermicum</i> (DSM 3669)	BSR	37 - 56 (54)	2 – 50 (24-34)	Aquifère géothermal continental (2500 m de profondeur)	(Daumas et al., 1988)
<i>Petrotoga mexicana</i> (DSM 14811)	Bactérie thiosulfato-réductrice	25 – 65 (55)	10 - 200 (30)	Eau de gisement pétrolier	(Miranda-Tello et al., 2004)
<i>Thermosipho japonicus</i> (DSM 13481)	Bactérie thiosulfato-réductrice	45 - 80 (72)	6,6 – 79 (40)	Paroi d'une cheminée hydrothermale (972 m de profondeur)	(Takai et Horikoshi, 2000)
<i>Thermovirga lienii</i> (DSM 17291)	Bactérie fermentaire	37 - 68 (58)	5 - 80 (20 - 30)	Eau de formation pétrolifère	(Dahle et Birkeland, 2006)
<i>Halotheomothrix orenii</i> (OCM 544)	Bactérie fermentaire	45 - 68 (60)	40 - 200 (50 - 100)	Sédiment de surface d'un lac hypersalé	(Cayol et al., 1994)

Chaque souche a été pré-cultivée sur le milieu recommandé par la DSMZ, à pression atmosphérique à 30, 40 ou 55°C en fonction de la température optimale de croissance du microorganisme considéré, dans le but d'obtenir une quantité suffisante de biomasse métaboliquement active pour inoculer les milieux anoxiques expérimentaux.

De plus, pour chaque souche, un milieu anoxique expérimental, dont la composition minérale de base équivaut à 13 g.L⁻¹ de NaCl, a été conçu pour cette étude. Cette salinité minimale a été définie afin de correspondre à la force ionique *I* (équation 1) la plus élevée, calculée pour tous les milieux de référence des différentes souches. Ces calculs ont été réalisés en prenant en compte l'ensemble des sels à l'exception du NaCl afin d'homogénéiser les fonds ioniques des différents milieux de culture pour une même salinité. Ainsi, une égalité des forces ioniques, et par conséquent de salinité, est toujours obtenue en incorporant la même quantité de NaCl dans les milieux de base des différentes souches.

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=0}^n z_i^2 \cdot [X_i] \quad \text{Équation 1}$$

où $[X_i]$ représente les concentrations des *n* ions (*i*) de charges respectives z_i contenues dans la solution.

La composition des milieux utilisés durant l'étude est décrite en annexe 4. Les systèmes anaérobies de type « Batch » ont été soumis à un flux constant d'azote pendant 1 heure puis stérilisés. Avant inoculation, les milieux ont été amendés (à partir de solutions stock anaérobies et stériles) en NaHCO₃ (30 mM), vitamines et, pour les bactéries thiosulfato-réductrices, en thiosulfate (20 mM). Seuls les pH des milieux de base (équivalent à 13 g.L⁻¹ de NaCl) préalablement amendés ont été ajustés aux valeurs désirées (7 ou 7,2 en fonction des souches) à l'aide d'une solution de HCl 1 M. Ensuite, après l'ajout de NaCl nécessaire pour atteindre les salinités de travail (50, 110, 180, 260 g.L⁻¹ équivalent NaCl), toutes les valeurs de pH ont été vérifiées afin de s'assurer de leur maintien dans les gammes de croissance des souches. Les modifications du pH, inhérentes à l'ajout de NaCl, ont bien été prises en compte dans les calculs car les valeurs de pH sont directement liées à la salinité.

Après les pré-cultures en milieu DSMZ (inoculés au 1/10, v/v), les souches ont été ensemencées au 1/100 (v/v) dans leur milieu d'étude correspondant. Dans un premier temps, les concentrations en NaCl indiquées dans les milieux DSMZ ont été utilisées, afin de (i) vérifier l'adéquation des milieux d'étude avec la croissance des souches et (ii) d'accoutumer les souches métaboliquement actives à leur milieu de travail. Puis, cinq salinités ont été testées au cours des six conditions d'incubation définies pour l'étude (tableau 15). Les incubations sous pression ont été

réalisées en tubes Hungate remplis complètement en BAG en prenant soin d'éviter la formation de bulle de gaz. Toutes les incubations ont duré 30 jours.

Tableau 15. Conditions d'incubation dans les milieux d'étude

Conditions	1	2	3	4	5	6
Température (°C)	40	40	55	55	55	70
Pression (bars)	1	90	1	90	180	90
Salinités testées en équivalent NaCl (g.L ⁻¹)			13			
			50			
			110			
			180			
			260			

Des témoins négatifs abiotiques constitués de milieux non inoculés ont été réalisés lors des incubations à pression atmosphérique. En parallèle des différentes incubations, des témoins positifs de croissance, incubés à pression atmosphérique à 55 ou 40°C (selon la souche considérée) pour les cinq salinités des milieux d'étude, ont également été réalisées dans le but de s'assurer de la viabilité des inocula.

B.2. Mesures et traitements des données

Afin d'impacter au minimum sur la chimie des milieux de culture, un prélèvement unique, sur lequel différentes mesures ont été réalisées, a été effectué à t_{final} , *i.e.* $t_{30\text{jours}}$.

B.2.1. Mesures du pH

Les mesures de pH ont été réalisées avec une électrode pH SenTix® 41 (WTW), intégrant une correction automatique de la température, calibrée à l'aide de deux tampons techniques de pH 4,01 (WTW; TPL4) et 7,00 (WTW; TPL 7). Ces tampons, initialement de force ionique égale à 0,31, ont été amendés en NaCl ($I = 0,532$) dans le but de réduire les écarts de salinité entre les solutions de calibrations et les milieux d'étude et ainsi d'améliorer la détermination des pH de ces milieux fortement salés. Afin de minimiser les variations de pH provoquées par un dégazage, la procédure développée par S. Dupraz (communication personnelle) a été appliquée. L'électrode pH a été placée dans un tube

présentant un faible volume mort (< 1 mL) dans lequel l'échantillon liquide a été introduit grâce à une seringue munie d'une aiguille de faible diamètre (diamètre = 0,4 mm) le long de la paroi interne jusqu'en haut du tube. Les valeurs de pH ont été relevées 60 secondes après mise en contact du liquide avec l'électrode.

Toutefois, une erreur systématique du pH est induite par le potentiel de jonction liquide qui se développe entre deux fluides de salinités significativement différentes. Par conséquent, le pH mesuré a été converti en pH de concentration (Dickson, 1984) en prenant en compte la correction de ce phénomène électrochimique. Pour cela, le pH du tampon technique TPL 7 (calibré à pH = 7,00 pour $I = 0,31$) a été mesuré pour différentes forces ioniques (par dilution et ajout de NaCl dans TPL 7) et les valeurs ont été ajustées selon l'équation de la courbe de corrélation présentée dans la figure 24 (équation 2).

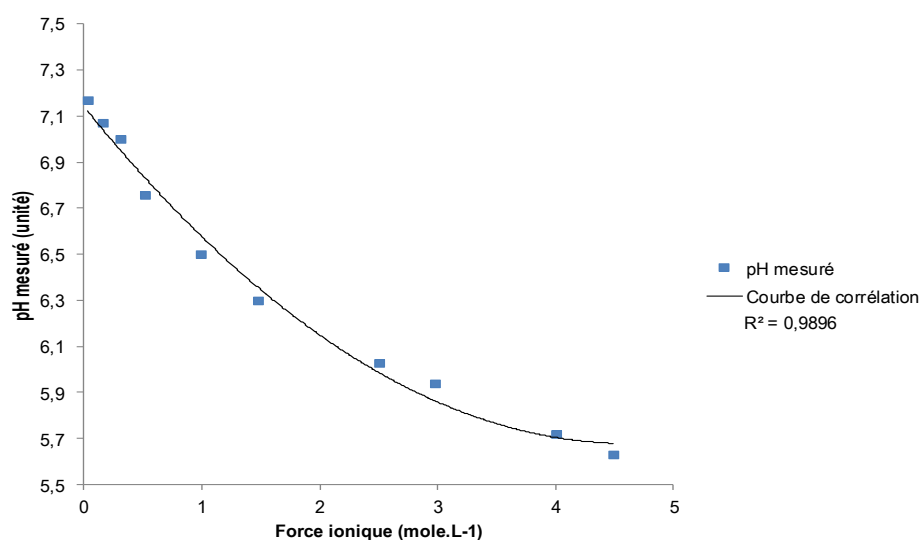


Figure 24. Corrélation entre la force ionique et le pH théorique mesuré pour le tampon technique TPL 7 (pH = 7,00 pour $I = 0,31$).

L'équation (2) de la courbe de corrélation obtenue à partir de ces points a permis de calculer le pH théorique mesuré ($\text{pH}_{\text{théorique mesuré}(I)}$) en fonction de la force ionique (I).

$$\text{pH}_{\text{théorique mesuré}(I)} = 0,0684 I^2 - 0,6329 I + 7,141 \quad \text{Équation 2}$$

Une estimation de la déviation moyenne de l'électrode pH concernant le biais dû au potentiel de jonction ($\bar{\alpha}_{\text{pH}}$) a été réalisée en soustrayant le pH théorique mesuré à une force ionique I au pH théorique mesuré à $I = 0,03$ *i.e.* pH = 7,141 (tampon technique TPL 7 dilué) (équation 3). Pour ce dernier point, le pH d'activité mesuré est considéré comme équivalent au pH de concentration (Stumm et Morgan, 1996).

$$\delta_{pH(I)} = 7,141 - pH_{\text{théorique mesuré}(I)} \quad \text{Equation 3}$$

L'existence d'un décalage entre les pH mesurés lors des expérimentations (tampon TPL 7 calibré à pH = 7,00 pour I = 0,523) et ceux utilisés pour établir la courbe de corrélation (tampon TPL 7 calibré à pH = 7,00 pour I = 0,31) a nécessité l'addition d'une valeur corrective à l'ensemble des pH mesurés ($pH_{(H^+)}$) calibré à pH = 7 à l'aide du tampon TPL 7 amendé (I = 0,523). Cette correction correspond à la différence entre la valeur de $pH_{\text{théorique mesuré}(I = 0,532)}$ et la valeur de calibration (pH = 7,00). Les valeurs de pH de concentration ($pH_{[H^+]}$) ont enfin été obtenues en additionnant les déviations moyennes aux valeurs de pH d'activité corrigées ($pH_{(H^+)\text{corrigé}}$) (équation 4).

$$pH_{[H^+]} = pH_{(H^+)\text{corrigé}} + \delta_{pH(I)} \quad \text{Equation 4}$$

De façon plus rigoureuse, la calibration relative au biais du potentiel de jonction est souvent réalisée en prenant de l'HCl pour fixer le pH afin d'éviter la dérive des pKa des acide faibles quand I augmente (Stumm et Morgan, 1996). Cependant cette option n'a pas été retenue afin de faire correspondre cette étude (au moins les solutions de faibles salinités) à l'ensemble des données de pH accumulées par la communauté des microbiologistes qui réalisent en général des calibrations dans des tampons pH commerciaux sans correction de salinité, la dérive des pKa est de plus considérée comme mineure face au biais du potentiel de jonction.

B.2.2. Mesures de la densité optique (DO)

La densité optique des échantillons liquides a été mesurée par absorbance à 600 nm à l'aide du système de spectroscopie UV-visible Agilent 8453 équipé du logiciel d'acquisition ChemStation (Agilent). Chaque mesure a été réalisée à partir d'1 mL de prélèvement dans une cuve plastique « semi-micro » à usage unique pour laquelle le trajet optique mesurait 1 cm.

B.2.3. Mesures de l'activité métabolique

Les productions d'acétate par les bactéries fermentaires, de méthane par les archées méthanogènes et d'hydrogène sulfuré par les bactéries sulfato- et thiosulfato-réductrices ont été quantifiées. Dans le but de comparer les activités des huit souches microbiennes dans les différentes conditions d'incubation testées, les concentrations totales en produits du métabolisme ont été converties en pourcentages d'activité en définissant, pour chaque souche, le maximum d'activité

comme la concentration en produit du métabolisme la plus élevée obtenue au cours des différentes expérimentations (normalisation).

Dosage des anions acétate par chromatographie ionique

A partir de chaque prélèvement réalisé sur les milieux fermentaires, un volume de 2 mL a été préalablement filtré sur 0,22 μm (filtres PTFE) et conservé à 4°C avant analyse. Les échantillons ont ensuite été dilués au 1/10 ou au 1/100 selon leur teneur en NaCl. Néanmoins, les fortes concentrations en chlorures interférant avec la lecture des anions acétate, les chlorures ont été éliminés par passage des échantillons sur résines échangeuses d'ions contenant du nitrate d'argent (Maxi Clean™ SPE 1,5 mL IC-Ag, Alltech) avant analyse par chromatographie ionique. Cette méthode d'analyse qualitative et quantitative est basée sur la séparation de molécules chargées à l'aide d'une phase mobile (l'éluant) le long d'une phase stationnaire (la colonne). L'appareil utilisé (Dionex 300) est un système de chromatographie ionique sans réactif avec génération d'éluant (RFIC™-EG¹⁹) comprenant un injecteur automatisé. La séparation des anions acétate a été réalisée à 30°C grâce à une colonne AS19 précédée d'une pré-colonne AG19 (Diomex) et selon un gradient de KOH. Les anions acétate ont été détectés par conductivité et quantifiés.

Analyse du CH₄ et de l'H₂S par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les teneurs en CH₄ et H₂S ont été dosées, soit directement à partir des phases gazeuses des milieux incubés, soit de manière indirecte après dégazage des gaz dissous contenus dans un prélèvement liquide d'environ 3 mL. Cette dernière procédure a notamment été appliquée pour les milieux incubés sous pression ne possédant pas de phase gazeuse. Pour les mesures indirectes, chaque prélèvement a été transféré dans une vacuette pré-flushée à l'azote (N₂) où, après injection du prélèvement, les espèces dissoutes et dégazées se sont équilibrées. De plus, les prélèvements des milieux méthanogènes et BSR ont été acidifiés à l'aide d'une solution d'HCl 1 M (100 $\mu\text{L/mL}$ de prélèvement) dans le but d'augmenter le dégazage des espèces dissoutes en déplaçant leur équilibre en solution vers les formes neutres associées. A l'opposé, les prélèvements des milieux thiosulfato-réducteurs n'ont pas reçu d'ajout d'HCl car leur acidification engendrait des précipitations de dérivés soufrés, devenant ainsi indétectables par CPG. Les mesures ont été réalisées à l'aide du chromatographe en phase gazeuse Varian 3400, par passage sur colonne remplie (Porapak Q) de 0,5

¹⁹ RFIC™-EG : reagent-free ion chromatography – Eluent generation

mL d'échantillon de gaz en utilisant l'hélium comme gaz vecteur à un débit de 30 mL.min⁻¹. L'H₂S et les faibles quantités de méthane ont été détectées par ionisation de flamme (FID) alors que la détection des teneurs élevées en méthane (au-delà de 0,1 %) a été effectuée par conductivité thermique (catharomètre), les deux détecteurs étant montés en série. Les quantifications, exprimées en pourcentage de gaz (CH₄ ou H₂S) présents dans la phase gazeuse, ont été réalisées à l'aide du logiciel Star (Varian) en utilisant comme étalons des mélanges de gaz de compositions connues.

B.2.4. Traitement des données de CPG

A partir de chaque analyse de CPG, la concentration totale de gaz (CH₄ ou H₂S) produits (C_{Total}) a été estimée en considérant la loi des gaz parfaits comme applicable. Les calculs, nécessaires à l'estimation, ont été organisés en quatre étapes.

Dans un premier temps, la concentration du gaz « dégazé » (C_{gaz}) a été calculée à partir de sa pression partielle (P_p) en tenant compte du volume de la phase gazeuse dans laquelle s'est effectué le dégazage (V_{gaz}) (équation 5).

$$C_{gaz} = \left(\frac{P_p \cdot V_{gaz}}{V_m} \right) \quad \text{Equation 5}$$

Avec $V_m = 24,4 \text{ L.mol}^{-1}$ correspondant au volume occupé par une mole de gaz dans les conditions standards de température et de pression (25°C et 1 atm) et défini par la loi des gaz parfait (équation 6) :

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad \text{Equation 6}$$

où P représente la pression (en atm), V le volume (en L), n le nombre de mole du gaz considéré, R la constante des gaz parfaits ($0,082057 \text{ L.atm.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) et T la température (en K).

et P_p la pression partielle du gaz considéré dont l'équation est dérivée de la loi de Dalton (équation 7) :

$$P_p = \frac{P_{tot} \cdot \%_{gaz}}{100} \quad \text{Equation 7}$$

qui inclut la pression de la phase gazeuse (P_{tot}) et le pourcentage du gaz dans le mélange gazeux ($\%_{gaz}$).

Dans un second temps, la concentration en gaz dissous (C_d) a été déterminée à l'équilibre (équation 8) dans le tube de mesure. Les constantes de Henry (K_h) étant propres à chaque gaz et fortement dépendantes de la salinité des milieux, les valeurs de K_h correspondantes aux salinités des milieux considérés ont été estimées en utilisant le modèle de Duan et Mao (2006) pour calculer la solubilité du méthane et celui de Duan et al. (2007) pour le calcul de la solubilité de l'H₂S.

$$C_d = K_h \cdot P_p \quad \text{Equation 8}$$

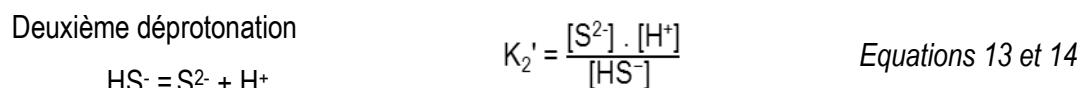
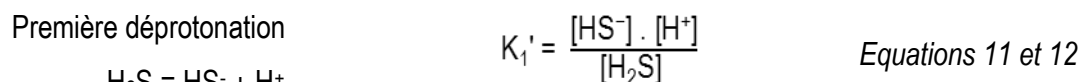
Ensuite, la concentration de l'ensemble des espèces associées au gaz et présentes en solution (C_t) a été déduite à partir de C_d en utilisant la fonction de fraction ionique α_0 (équation 9) détaillée ci-dessous :

$$C_t = \frac{C_d}{\alpha_0} \quad \text{Equation 9}$$

La fonction α_0 permet de s'affranchir des coefficients d'activité pour une force ionique (I) constante par l'utilisation des constantes d'équilibre apparentes (K') définies par les concentrations des différentes espèces présentes pour une condition donnée. Pour le méthane, gaz chimiquement inerte, les espèces en solution sont constituées exclusivement des formes CH_4 dissoutes permettant d'établir l'équation 10 :

$$C_t = C_d \quad \text{Equation 10}$$

A l'opposé, l' H_2S se présente, en solution, sous forme de trois espèces, décrites par les équations ci-dessous en utilisant les constantes apparentes (équations 11 à 15) :



Equation de conservation avec C_t concentration totale en espèces soufrées

$$C_t = [\text{H}_2\text{S}] + [\text{HS}^-] + [\text{S}^{2-}] \quad \text{Equation 15}$$

Les pK associés aux équations, dans les conditions standard ($T = 25^\circ\text{C}$; $P = 1 \text{ atm}$; $I = 0$), sont égaux à (Barbero et al., 1982; Millero, 1986) : $\text{pK}_1 = 6,98$ et $\text{pK}_2 = 13,78$

Comme un éloignement de deux unités de pH par rapport au pK_a suffit pour obtenir plus de 99% de l'acide associé (Gil, 1989), les espèces HS^- ont été négligées dans les prélèvements acidifiés et ainsi, l'égalité de l'équation 10 a été appliquée. Pour les liquides non acidifiés, seules les équations relatives à la première déprotonation de l' H_2S ont été considérées (le pH des milieux après incubation étant compris entre 6 et 9). Ainsi, selon les équations 9, 11, 12 et 15, la fonction α_0 correspondante a été établie (équation 16) comme :

$$\alpha_0 = \frac{[\text{H}^+]}{K_1' + [\text{H}^+]} \quad \text{Equation 16}$$

où $[H^+] = 10^{-pH}$, le pH associé étant le pH de concentration ($pH_{[H^+]}$) calculé dans l'équation 4. Il est important de préciser que les modifications de pH dues au dégazage d' H_2S dans les vacuettes ont été prises en compte. En effet, les $pH_{[H^+]}$ ont été calculés afin de correspondre aux pH des milieux dégazés. Pour $K_1' = 10^{-pK_1'}$, les valeurs de pK_1' ont été ajustées aux salinités des milieux considérés d'après l'équation de Millero (1982) en utilisant les mesures de pK_1 de l' H_2S dans l'eau de mer dont l'échelle des pH est basée sur la concentration totale en H^+ (Almgren et al., 1976) (équations 17, 18 et 19) :

$$pK_1' = pK_1 + AS^{1/2} + BS \quad \text{Equation 17}$$

$$A = -0,2391 + \frac{35,685}{T} \quad B = -0,0109 + \frac{0,3776}{T} \quad \text{Equations 18 et 19}$$

où S et T correspondent respectivement à la salinité (en g.L⁻¹) et la température (en K) de l'eau de mer.

Enfin, la concentration totale de CH_4 ou de H_2S (C) a été calculée en additionnant les concentrations de la phase gazeuse avec celle de la phase liquide. Pour les mesures directes (réalisées à partir des phases gazeuses des milieux de culture incubés à pression atmosphérique), les concentrations totales (C_{Total}) ont été déterminées en cumulant les concentrations du composé sous sa forme gazeuse (C_{gaz}) et ses différentes formes en solutions (C_t) (équation 20). Il en va de même pour les milieux incubés sous pression où, du fait de l'absence de phase gazeuse dans les milieux incubés, la concentration totale en CH_4 ou en H_2S calculée à partir du prélèvement est identique à celle du milieu d'origine.

$$C_{Total} = C_{gaz} + C_t \quad \text{Equation 20}$$

Pour les mesures réalisées à partir de prélèvements liquides issus des milieux incubés à pression atmosphérique, l'équation 20 n'est pas représentative de la concentration totale mais uniquement de la concentration de l'ensemble des espèces dissoutes du gaz dans le milieu initial (C_{liq}). Par conséquent, une étape supplémentaire a été réalisée afin de prendre en compte les concentrations en CH_4 ou en H_2S présentes dans les phases gazeuses des cultures initiales (C_i) (équation 21).

$$C_{Total} = C_{liq} + C_i \quad \text{Equation 21}$$

avec $C_{liq} = C_{gaz} + C_t$

Les concentrations en CH_4 ou en H_2S dans les mélanges gazeux initiaux ont été déterminées en suivant l'inverse du raisonnement décrit précédemment, *i.e.* à partir de la concentration de l'ensemble des espèces d'un composé en solution a été déduite la concentration du composé sous forme gazeuse. Ainsi, selon les équations 8 et 10, les concentrations de méthane gazeux dans les milieux de culture ont été déduites (équation 22) :

$$C_i = \frac{C_{liq} \cdot V_{gaz}}{K_h \cdot V_m} \quad \text{Equation 22}$$

Pour l'H₂S, une nouvelle fonction α_0 a été déterminée pour chaque C_{liq} à partir du pH du milieu mesuré avant dégazage permettant de calculer C_i (équation 23) :

$$C_i = \frac{C_{liq} \cdot \alpha_0 \cdot V_{gaz}}{K_h \cdot V_m} \quad \text{Equation 23}$$

B.3. Plan d'expérience

Les résultats obtenus à partir des conditions 1 à 4 (tableau 15) ont été analysés et interprétés à l'aide d'un plan d'expérience.

B.3.1. Définition et généralités

Les plans d'expériences permettent de rechercher le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt appelée réponse y et des variables nommées facteurs x_i pouvant modifier la valeur de y . Donc, ils permettent de s'intéresser à la fonction :

$$y = f(x_i)$$

De plus, les plans d'expériences organisent et optimisent les essais dans le but d'acquérir le maximum de renseignements à partir d'un minimum d'expériences permettant ainsi d'accroître la précision sur les réponses calculées avec un modèle. Par conséquent, la variation simultanée de plusieurs facteurs est, selon certaines règles, plus efficace que les variations intuitives de base qui consiste à faire varier un facteur à la fois.

Les plans d'expériences peuvent être classés en deux catégories en fonction de la nature de leurs facteurs :

- les facteurs dépendants liés entre eux par une relation,
- les facteurs indépendants dont les niveaux choisis n'entraînent aucune contrainte sur le choix des niveaux des autres facteurs.

Parmi les plans d'expérience utilisant des facteurs indépendants, les plans factoriels complets basés sur une matrice dite d'Hadamard, permettent d'estimer l'influence de différents facteurs sur une réponse donnée. Cette réponse est contenue dans un « domaine d'étude », lui-même défini par la réunion des domaines de variation de chaque facteur. Chaque domaine est délimité par deux valeurs extrêmes appelées niveau bas et niveau haut. Par habitude, le niveau bas est noté -1 et le niveau haut +1.

B.3.2. Construction du plan factoriel complet

Un plan factoriel complet à deux niveaux a été conçu dans le but d'évaluer l'influence de la pression, de la température et de la salinité sur les capacités métaboliques de huit souches microbiennes anaérobies. Un cadre expérimental a été fixé afin de concevoir une application indépendante du type de microorganisme utilisé.

Les trois facteurs (représentés par A, B et C dans le tableau 16) ont été définis en fonction de deux conditions extrêmes (niveaux -1 et +1). Un plan factoriel complet a nécessité la mise en place de $2^3 = 8$ expériences, 2 correspondant au nombre de niveaux et 3 au nombre de facteurs étudiés.

Tableau 16. Plan factoriel 2^3 complet pour l'étude de 3 facteurs A, B et C

Expériences	Facteurs			Réponses
	A	B	C	
1	-1	-1	-1	y1
2	+1	-1	-1	y2
3	-1	+1	-1	y3
4	+1	+1	-1	y4
5	-1	-1	+1	y5
6	+1	-1	+1	y6
7	-1	+1	+1	y7
8	+1	+1	+1	y8

Pour chaque expérience, une réponse (y_1, y_2, \dots, y_8) est mesurée et l'ensemble des réponses est compilée dans une matrice de résultats (tableau 16). Une matrice orthogonale²⁰ a ensuite été générée pour le plan factoriel 2^3 complet. Le traitement matriciel a permis de déterminer la moyenne de la réponse (a_0) ainsi que les effets des facteurs et de leurs interactions par multiplication de la matrice d'Hadamard avec la matrice de résultats puis division de l'ensemble par le nombre d'expériences (8 dans notre cas) (tableau 17). L'effet d'un facteur coïncide avec la variation de la réponse entre le centre du domaine d'étude et le niveau haut de ce même facteur. Ainsi, une valeur positive de l'effet

²⁰ Matrice orthogonale : Une matrice carrée A composée de n lignes et n colonnes à coefficients réels est dite orthogonale si elle vérifie : $A^t \cdot A = I_n$ où A^t est la transposée de A et I_n la matrice identité

correspond à une augmentation de la moyenne a_0 entre les positions 0 et +1. La présence d'interaction entre deux facteurs indique que l'effet d'un facteur dépend aussi du niveau d'un autre facteur. Une étude relative des facteurs et de leurs interactions a été menée par classification de leurs capacités plus ou moins fortes à faire varier la réponse étudiée.

Tableau 17. Traitement matriciel du plan factoriel 2^3 complet.

Expériences	Moyenne	Facteurs purs			Interactions				Réponses
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	y_1
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	y_2
3	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	y_3
4	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	y_4
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	y_5
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	y_6
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	y_7
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	y_8
Effets	a_0	a_A	a_B	a_C	a_{AB}	a_{AC}	a_{BC}	a_{ABC}	

où

$$a_0 = (y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8)/8$$

$$a_A = (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8)/8$$

$$a_B = (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)/8$$

$$a_C = (-y_1 - y_2 - y_3 - y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8)/8$$

$$a_{AB} = (y_1 - y_2 - y_3 + y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8)/8$$

$$a_{AC} = (y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8)/8$$

$$a_{BC} = (y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)/8$$

$$a_{ABC} = (-y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8)/8$$

B.2.5. Modélisation des données

Pour un plan factoriel 2^3 complet, le modèle postulé est un modèle du premier degré avec interaction répondant à l'équation ci-dessous (équation 25) :

$$y = a_0 + a_A \cdot X_A + a_B \cdot X_B + a_C \cdot X_C + a_{AB} \cdot X_A X_B + a_{AC} \cdot X_A X_C + a_{BC} \cdot X_B X_C + a_{ABC} \cdot X_A X_B X_C + \varepsilon$$

Avec a_0 : la moyenne des réponses

a_A, a_B, \dots, a_{ABC} : les effets des facteurs et de leurs interactions

x_A, x_B, x_C : les variables centrées réduites des facteurs A, B et C

ε : le résidu (ici considéré comme nul).

Cette équation a été utilisée pour la modélisation des réponses en fonction de l'effet des facteurs et de leurs interactions.

B.3.4. Définition des facteurs du plan factoriel 2³ complet

Dans le cadre de notre étude, les facteurs A, B et C correspondent respectivement à la température d'incubation, la pression d'incubation et la salinité des milieux. Des milieux de culture de différentes salinités ont été préparés à 13, 50, 110, 180 et 260 g.L⁻¹ équivalent NaCl. Les milieux de culture ont été incubés à 40 ou 55 °C sous pression atmosphérique ou en appliquant une pression de 90 bars. Les niveaux hauts et bas attribués aux trois facteurs sont résumés dans le tableau 18.

Tableau 18. Définition des niveaux de trois facteurs pour les plans factoriels 2³ complets

	Température (A)	Pression (B)	Salinité (C)			
Niveau bas (-1)	40°C	1 bar	13	50	110	180
Niveau haut (+1)	55°C	90 bars	50	110	180	260

Chapitre III :

**Caractérisation des formations
triasiques traversées par le
forage profond EST433, ANDRA**

Suite à la conclusion sur la faisabilité d'un stockage de déchets radioactifs MHA-VL dans la couche du Callovo-Oxfordien (Dossier ANDRA, 2005 ; loi n°91-1381 codifiée sous la forme des articles L542-1 et suivants du code de l'environnement ou loi Bataille, 1991), l'ANDRA a réalisé plusieurs forages, dont le forage EST433 en position centrale, dans la zone de transposition (ZT) du laboratoire souterrain de Meuse/Haute Marne afin de définir l'emplacement d'un potentiel site de stockage. L'une des singularités de cette zone géographique a résidé dans l'absence de toute particularité structurale telle que les failles ou les zones de porosités anormalement élevées. Jusqu'à présent, l'essentiel des données acquises sur les compartiments du Trias dans le Bassin de Paris provenait de précédents forages organisés dans le cadre de prospections pétrolières (Brunet et Le Pichon, 1982; Fontes et Matray, 1993b). De plus, le forage EST433 constitue l'un des seuls forages continentaux profonds entrepris depuis la surface dans un environnement sédimentaire non perturbé jusqu'à plus de 1700 m de profondeur et pour lequel des échantillons naturels ont été alloués pour des recherches microbiologiques. Par conséquent, la réalisation d'un tel ouvrage a fourni une réelle opportunité d'explorer et d'étudier les formations triasiques profondes d'un bassin sédimentaire français, le Bassin Parisien.

A travers une caractérisation minéralogique et physico-chimique d'échantillons de roches, l'objectif de cette partie a été de mieux appréhender les caractéristiques des formations sédimentaires sur lesquelles ont reposé les analyses microbiologiques dans le but d'évaluer la présence d'une potentielle vie microbienne par la prise en compte de différents facteurs déterminants, tels que la température, la salinité, les teneurs en eau et le diamètre poral. De plus, l'acquisition d'une meilleure compréhension de l'évolution de l'histoire géologique des formations du Trias dans le Bassin de Paris et du fonctionnement du système hydrogéologique entre les compartiments triasiques ont également permis d'initier une réflexion sur l'origine des fluides.

1. Descriptions lithostratigraphiques des formations du Trias moyen

Dans cette étude, les formations qui ont fait l'objet d'une étude approfondie appartiennent aux formations du Trias moyen. Ces faciès sont situés entre les formations du Permien et la formation salifère du Keuper (figure 25). La description ci-dessous des différentes passes est extraite du rapport final d'opération du forage EST433 (document ANDRA, DRP 0GRS 08 0007).

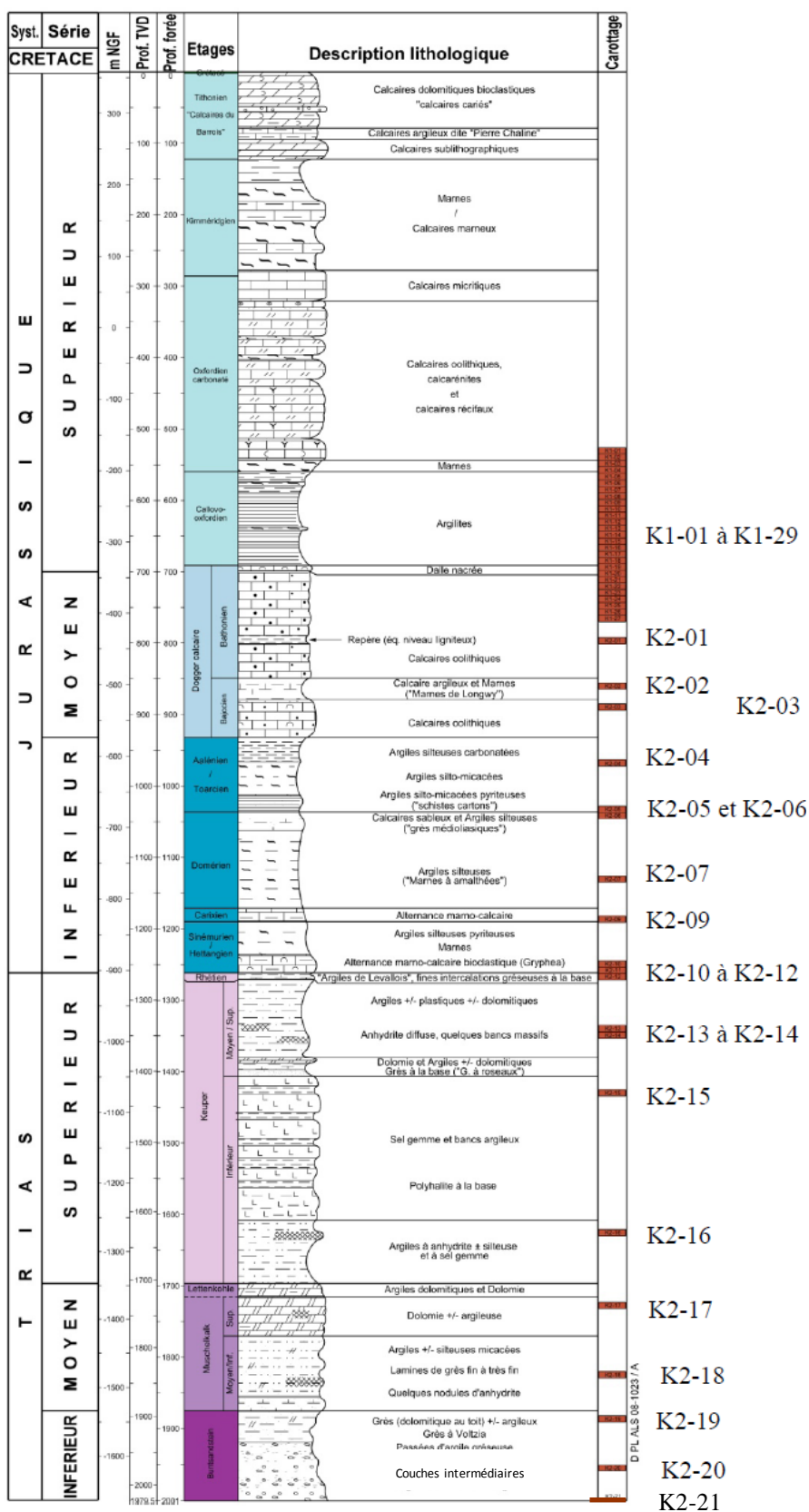


Figure 25. Localisation des carottes sur une coupe synthétique des terrains du Trias, Lias et Jurassique à l'aplomb du forage EST433. L'actualisation de ce log stratigraphique est en cours.

La passe K2-20 correspond au faciès rouge rubéfié des « couches intermédiaires » du Buntsandstein et plus particulièrement à la partie basale hétérogène de cette formation, située de 1951 à 1988 m de profondeur forée. Cette passe se présente sous la forme d'un grès grossier parfois arkosique²¹ et/ou conglomératique suivi d'environ 8 m d'argile localement silto-gréseux. Plus précisément, la passe K2-20 est constituée d'une alternance :

- de grès grossier à très grossier de couleur rouge à matrice argileuse blanche, à grains de taille très hétérogène et à éléments conglomératiques (galets polygéniques arrondis pluricentimétriques de quartzite blanc, d'argilite verte ou rouge et de roche volcanique) où la muscovite est omniprésente; et,
- de grès, moyen à grossier, arkosique, rouge-brun foncé contenant localement quelques petits horizons à galets de quartzite blanc. Le faciès des « couches intermédiaires » est caractéristique des dépôts sédimentaires des chenaux fluviaux correspondant à des rivières de faible sinuosité et associés à des plaines alluviales et des environnements lacustres (Bourquin et al., 2006).

La passe K2-19 appartient à la formation dite des *Grès à Voltzia* du Buntsandstein supérieur, caractérisée par un grès moyen à grossier, blanchâtre à verdâtre, propre, friable, argileux, plus ou moins riche en matière organique et à grains de quartz transparents anguleux à sub-arrondis. Une grosse passée d'argile verte, homogène, micacée, riche en très fins débris de végétaux, est présente entre 1888 et 1890,40 m. De très gros fragments de « lignite » ainsi que de la pyrite ont été notés au pied de la passe. Ce grès contient par ailleurs quelques feldspaths roses ainsi que de la glauconie.

La passe K2-18 a été extraite de la formation du Muschelkalk moyen et inférieur, et est composée de deux parties. La première, de 1820 (tête de la passe) à 1822 m, est constituée d'argile rouge brique silteuse à fines passées argileuses blanchâtres et à minces niveaux de grès rouge à micas blancs. La seconde, située entre 1822 et 1829 m de profondeur (pied), correspond à une alternance décimétrique à centimétrique d'argile rouge et verte plus ou moins silteuse et de lamines gréseuses claires micacées. Les nodules et/ou bancs d'anhydrite blanche sont fréquents. Ce faciès évaporitique, appartenant à la formation géologique des « couches rouges », correspondrait à des dépôts en milieu fluvial à énergie relativement faible.

Le faciès dur et cassant de la passe K2-17 appartient au Muschelkalk supérieur et est caractérisé par des faciès carbonatés dolomitiques. La passe est composée de dolomie (carbonate de calcium et de magnésium) beige à beige foncée contenant parfois des nodules d'anhydrite et de gypse

²¹ Grès arkosique : grès composé majoritairement de quartz (60%) et de feldspath (au moins 25 %), lié grâce à un ciment argileux (environ 15 %). Les roches arkosiques sont des roches sédimentaires détritiques terrigènes.

(sulfate de calcium) beige clair, à passées de dolomie argileuse beige foncé à gris et d'argile dolomitique gris beige sombre. Les quatre mètres sommitaux sont représentés par une argile dolomitique brun-rouge. Ce faciès dolomitique argileux carbonaté est typique des lagunes côtières de pays chauds avec des apports terrigènes plus ou moins importants.

2. Histoire sédimentaire des compartiments triasiques

En se basant sur les descriptions lithostratigraphiques disponibles dans la littérature, les formations géologiques du Trias correspondent à une transgression marine depuis le Bassin Germanique, faisant suite à la longue histoire continentale du Permien. La transgression marine a été induite par une extension tectonique active pendant la phase Permo-Triasique suivie d'une subsidence thermique progressive au milieu du Trias (Brunet et Le Pichon, 1982; Pomerol, 1989). Cette transgression marine est marquée par l'évolution des faciès du Buntsandstein (K2-20 et K2-19), de nature essentiellement détritique continentale, vers les faciès du Muschelkalk (K2-18 et K2-17) où se sont développés des niveaux argilo-carbonatés d'origine margino-littoraux et littoraux avec quelques passées finement gréseuses (environnements deltaïques). Cette modification progressive constitue la preuve de la poursuite de la phase transgressive et de l'influence marine de plus en plus importante dans les compartiments géologiques supérieurs. Les systèmes fluviaux mis en place sont alors connectés avec des faciès marins peu profonds, eux même reliés à l'océan Téthys (Bourquin et al., 2006). Ainsi, l'histoire géologique du Bassin de Paris est composée d'une succession d'épisodes transgressifs séparés par des phases de régressions marines voire d'émersions et s'est terminée par une continentalisation définitive à l'Oligocène.

3. Températures et paléo-températures des formations du Trias au cours de l'évolution du bassin

Une température *in-situ* de 66°C a été mesurée à 1880 m de profondeur forée (ou 1862 m verticalisée) (document ANDRA D PL ALS 09-0264/A). En considérant une température moyenne de surface de 10°C, le gradient géothermique régional associé au forage EST433 a été évalué à 3°C/100 m.

Des traces de fission dans les minéraux d'apatite ont été observées dans les échantillons originaires des passes K2-18, K2-19 et K2-20. Les traces de fission sont induites par la fission spontanée de l'²³⁸U contenu dans les minéraux d'apatite. Les traces de fission sont maintenues dans

les apatites tant que la température n'excède pas une température critique, variable en fonction de minéraux. Lors d'une augmentation de température (au-dessus de la température critique), les traces de fission se cicatrisent par raccourcissement de leurs extrémités. La majorité des traces de fission présentes dans les compartiments du Trias ont été datées de 50 millions d'années et certaines de 100 millions d'années. L'analyse de ces traces de fission a également permis d'estimer une paléotempérature maximale subie par les grès du Buntsandstein aux alentours de $90 \pm 5^\circ\text{C}$ (Barbarand, communication personnelle). Cette estimation a été confirmée par l'extrapolation des données microthermométriques obtenues des inclusions fluides contenues dans les cristaux d'halite dans la formation du Keuper (Blaise, communication personnelle).

Certaines données minéralogiques et pétrographiques, comme la présence de minéraux d'illite dans les grès du Trias, a également suggéré la circulation de fluides en déséquilibre thermique avec l'encaissant au cours de l'histoire géologique du Bassin de Paris. Ces fluides auraient atteint une paléotempérature de l'ordre de 110°C , température légèrement supérieure à celle indiquée précédemment (Ploquin, communication personnelle).

Les traces de fission d'apatites ont permis de dater le soulèvement du Bassin de Paris à la fin du Crétacé/début du Tertiaire. Les paléotempératures légèrement supérieures à celle connues actuellement dans les compartiments du Trias pourraient être expliquées par l'existence d'une formation géologique superficielle de 500 m d'épaisseur, de nos jours disparue, qui aurait provoqué un enfouissement maximal lors du Crétacé. L'érosion de ce faciès aurait réduit la charge sédimentaire contribuant ainsi à une remontée postérieure du Bassin et par conséquent, à une diminution des températures.

4. Matériels étudiés - Provenance des échantillons

Quatre échantillons provenant des 4 passes K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17 ont été analysés par DRX et observés en lames minces dans le but d'identifier la minéralogie et les textures composant chaque échantillon (annexe 5).

Les trois sections (EST31465, EST31466, EST31467) provenant de la passe K2-20 qui nous ont été confiées se situent entre 1936 et 1937 m de profondeur verticalisée. L'analyse en lame mince

de l'échantillon EST465 a montré un grès de type litharénite²² à feldspath, grossier à très grossier, de couleur rouge à matrice argileuse et à éléments conglomératiques (figure 26).

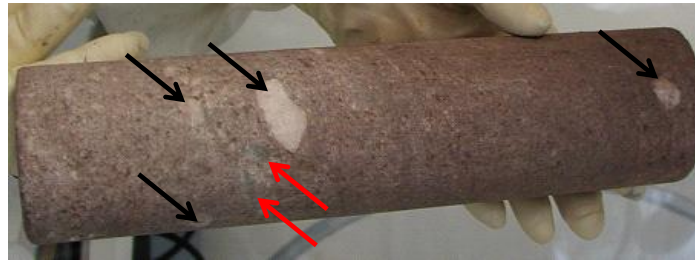


Figure 26. Echantillons EST31465 de la passe K2-20 carotté dans le Trias moyen. Les flèches noires indiquent certains éléments conglomératiques et les rouges l'emplacement de matrice argileuse facilement visualisable.

Les trois échantillons appartenant à la formation dite des *Grès à Voltzia* (EST31602, EST31603, EST31604) ont été prélevés de la passe K2-19 aux alentours de 1865 m de profondeur verticalisée (figure 27). L'observation en lame mince de l'échantillon EST31602 a montré qu'il s'agissait d'un grès de type litharénite à feldspath avec présence d'un ciment anhydrite.

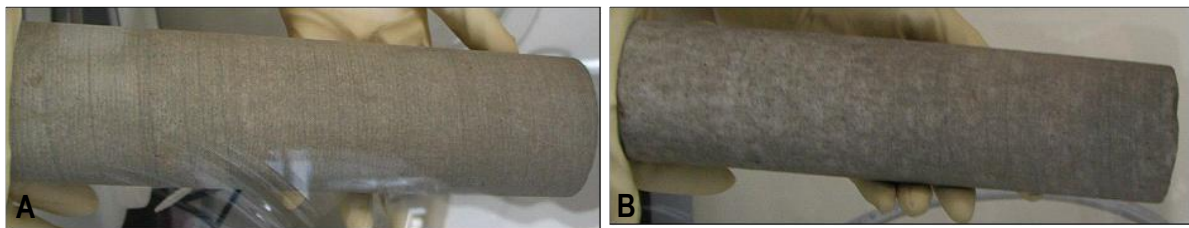


Figure 27. Echantillons de *Grès à Voltzia* : EST31602 (A) et EST31604 (B). Une différence de granulométrie est directement observable entre ces deux carottes distantes de 30 cm. Les grains de la carotte (B) sont beaucoup plus grossiers que ceux de la carotte (A).

Les échantillons EST31570, EST31571 et EST31572, situés entre 1808,40 et 1809,30 m de profondeur verticalisée, appartiennent à la formation du Muschelkalk inférieur et moyen (figure 28). En lame mince, l'échantillon EST31571 se présentait comme un grès lité comportant un niveau anhydrite plus ou moins carbonaté et un niveau à ciment carbonaté dominant. Le litage fruste est souligné par des galets mous et recoupé par une fissure à remplissage d'argile.

²² Litharénite : grès contenant plus de 95% de quartz et plus de fragments rocheux que de feldspath.



Figure 28. Echantillon EST31572 fractionné à partir de la passe K2-18 originaire du Trias moyen.

L'échantillon EST31387, situé à 1709 m de profondeur verticalisée, provient de la formation du Muschelkalk supérieur, et plus précisément de la partie composée de dolomie argileuse beige foncé à gris et d'argile dolomitique gris beige sombre contenant des nodules d'anhydrite et de gypse beige clair (figure 29). L'observation en lame mince de l'échantillon EST31387 a montré un grès à ciment carbonaté recoupé par des fentes ou fissures à remplissage de quartz diagénétique et d'anhydrite.



Figure 29. Echantillon EST31386 foré dans le Trias moyen.

5. Les eaux dans les formations du Trias

Teneurs en eau

Le stockage sous azote entraînant une désaturation des roches en eau et ainsi une modification des teneurs initiales, les teneurs en eau n'ont pas été réalisées à partir de nos échantillons. Par conséquent, les teneurs massique en eau ont été mesurées à partir d'autres échantillons de roches prélevés à 1727,60 ; 1730,38 ; 1823,40 ; 1887,49 ; 1889,95 ; 1956,20 ; 1958,69 et 2000,32 m de profondeur forée (MD) (document ANDRA, D.RP.0GRS.08.0006). Le profil obtenu (figure 30) a permis de mettre en évidence une importante variation du contenu en eau, comprise entre 0,47 et 9,19 %, dans les formations géologiques du Trias traversées par le forage EST433. Les formations triasiques les plus profondes K2-20 et K2-19 ont montré les teneurs en eau les plus élevées, respectivement 6,76 et 9,19 % mesurées à 1958,69 et 1887,49 m MD. Les plus faibles contenus en eau (inférieurs à 1%) ont été rencontrés pour les échantillons originaires de la passe K2-17.

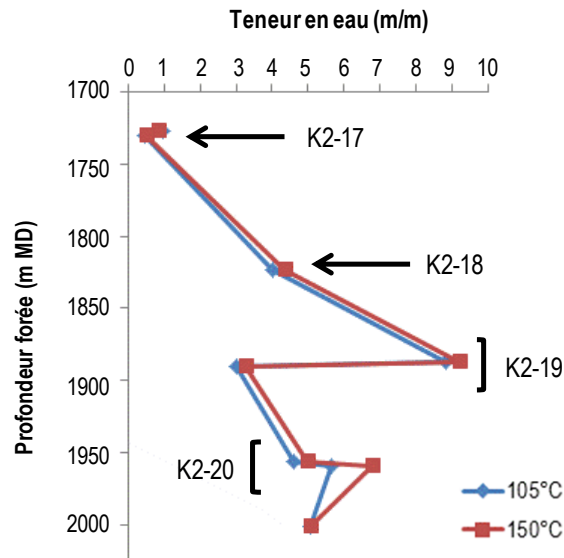


Figure 30. Profil des teneurs en eau des roches sédimentaires du Trias. Les données sont extraites du rapport de mesure du forage EST433 (document ANDRA, D.RP.0GRS.08.0006).

L'analyse des profils RMN (figure 31) a révélé la présence de deux zones aquifères dans le Buntsandstein marquées par des teneurs en eau libre régulière et moyenne (5-10%) au niveau des couches intermédiaires (K2-20) et régulière et élevée (10 à 15%) dans les grès à Voltzia (K2-19). Ces intervalles de fortes charges hydriques sont également corrélés avec des zones de forte porosité localisées entre 1929 à 1969 m MD dans le faciès des « couches intermédiaires » et entre 1875 à 1920 m MD dans les grès à Voltzia. Les profils RMN des faciès supérieurs ont montré des teneurs en eau libre très faibles voire quasi-nulles.

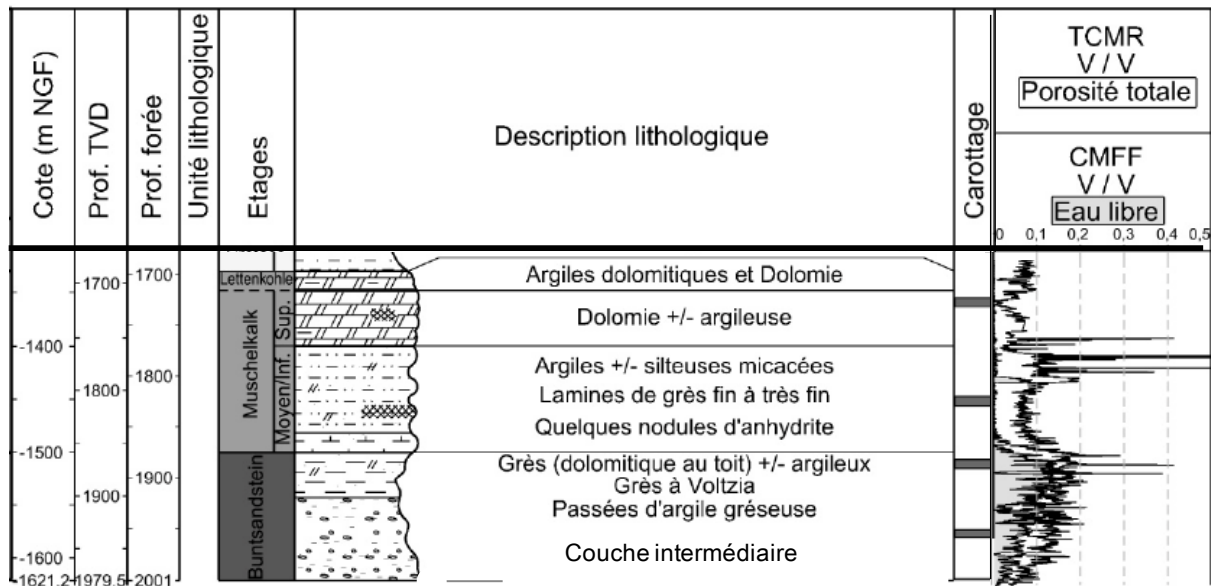


Figure 31. Log composite et profils RMN (TCMR et CMFF) des formations triasiques rencontrées dans le forage EST433. Les données sont extraites du rapport de mesure du forage EST433 (document ANDRA, D.RP.0GRS.08.0006A). Les méthodes TCMR (Total Combinable Magnetic Resonance porosity) et CMFF (Combinable Magnetic Resonance Free Fluid volume) permettent de mesurer respectivement la porosité totale et la teneur en eau des formations sédimentaires.

Porosités

Des mesures de porosité ont été réalisées par porosimétrie mercure sur les quatre carottes EST31467, EST31602, EST31571 et EST31387 correspondant respectivement aux passes K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17, conditionnés en sacs aluminium sous azote (annexe 5), afin de compléter les données ANDRA mais également de connaître le diamètre des pores de chaque roche, caractéristique importante pour l'évaluation de la potentielle présence de vie microbienne. Les porosités mercure étaient approximativement de l'ordre de 18, 15, 8 et 5 % respectivement (figure 32). Les valeurs de perméabilité, calculées à partir de ces données selon la méthode de Katz et Thompson (1986), ont permis une classification des roches du Trias en deux groupes : les roches de perméabilité inférieure à $0,1 \mu\text{darcy}$ constituées essentiellement de pores mesurant moins de $0,05 \mu\text{m}$ de diamètre (K2-18 et K2-17) et les roches de perméabilité supérieures à 50 mdarcy dont le réseau poral était principalement composé de pores supérieurs à $10 \mu\text{m}$ de diamètre (K2-20 et K2-19). La roche K2-20 s'est présentée comme la seule roche dont le réseau poral était formé de deux catégories de pores : une grande majorité mesurant entre 80 et $30 \mu\text{m}$ de diamètre et dans une moindre mesure, des pores d'environ $15 \mu\text{m}$ de diamètre (figure 32).

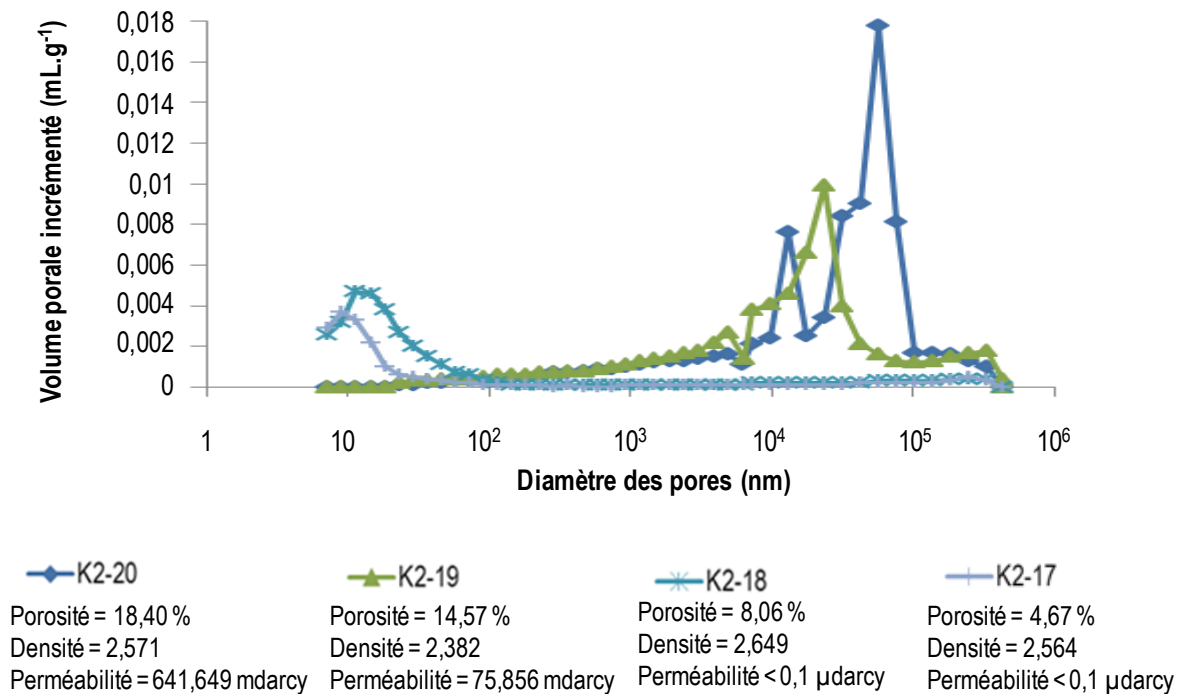


Figure 32. Distribution du réseau poral dans les roches sédimentaires du Trias et porosimétrie mercure (analyses réalisées au BRGM dans le cadre de cette thèse).

6. Lixiviation des roches et eaux naturelles prélevées

Les eaux naturelles de la formation des grès à Voltzia ont été prélevées entre 1879 et 1904 m de profondeur forée et analysées par Rebeix et al. (sous presse). Aucun prélèvement d'eau n'a pu être réalisé dans le niveau aquifère des couches intermédiaires. Pour ces raisons, des lixiviations à l'eau milliQ ont été réalisées sur nos 4 échantillons dans le but d'acquérir des informations complémentaires (tableau 19 ; annexe 5).

Tableau 19. Analyses géochimiques des lixiviats à l'eau milliQ (liquide/solide = 10) des échantillons naturels de roches du Trias réalisées au BRGM. L'échantillon référence 31467 a été fractionné à partir de la passe K2-20, l'échantillon 31602 à partir de K2-19, l'échantillon 31571 à partir de K2-18 et l'échantillon 31387 à partir de K2-17.

Numéros des passes	Références ANDRA	Cl ^(a)	Br ^(a)	SO ₄ ^(a)	F ^(a)	NH ₄ ^(a)	Na ^(a)	Ca ^(a)	K ^(a)	Mg ^(a)	pH
K2-20	EST31467	68,76	0,34	0,12	0,11	9,42.10 ⁻³	104,35	0,8	1,2	1,3	7,93
K2-19	EST31602	61,10	0,29	8,69	0,11	0,04	121,74	8,75	1,6	1,2	7,42
K2-18	EST31571	39,27	0,18	22,60	0,16	0,014	191,30	71	1,2	1,2	7,49
K2-17	EST31387	17,80	0,08	24,91	0,05	8,31.10 ⁻³	165,22	63	0,5	1,9	7,70
TW^(b)	EST03257	2579,13	15,4567	12,18	nd	nd	1976,97	167,2	55,12	142,77	6,47

^(a) en mM

^(b) TW pour Triassic water (Rebeix et al. sous presse)

nd : non déterminé

La concentration en chlore des lixiviats de grès s'étendait de 18 à 69 mM, alors que celle de l'eau du Trias avait une valeur, au minimum, 35 fois supérieure. Le principal cation des roches sédimentaires était le sodium, entre 105 et 191 mM, suivi par le calcium, de 0,8 à 63 mM. Cette tendance a aussi été constatée pour l'eau circulant à travers le Trias avec toutefois des concentrations en Na et en Ca nettement supérieures, 1977 et 167 mM respectivement. Des concentrations plus élevées en Br, K et Mg ont été également mesurées dans l'eau collectée des grès à Voltzia. A l'inverse, les teneurs en sulfate les plus importantes ont été retrouvées pour les échantillons K2-18 et K2-17, de l'ordre de 23 et 25 mM respectivement. L'eau naturelle étant beaucoup plus salée que les lixiviats, les teneurs en sels de l'eau naturelle du Trias ne semblent pas être contrôlées par les formations géologiques à l'exception de la concentration en sulfate pour laquelle les valeurs sont du même ordre de grandeur (8,69 pour le lixiviat et 12,18 pour l'eau naturelle des grès à Voltzia). Les concentrations en sulfate pourraient être induites par la dissolution de l'anhydrite alors que les autres sels seraient le résultat de différents apports comme par exemple les formations salifères sus- et sous-jacentes.

De faibles concentrations en azote ammoniacal ont été détectées dans les roches (entre 8.10^{-3} et 4.10^{-2} mM). D'importants pics d' H_2 , supérieurs à 400 ppm, ont été visualisés sur les diagraphies instantanées au niveau de la passe K2-18 (document ANDRA, DRP06GRS080007A-log-500). Les valeurs de pH sont situées autour de la neutralité voire légèrement alcalin (6,5 pour la mesure directe à partir de l'eau du Trias et compris entre 7,4 et 8 à partir des lixiviats de roches).

La salinité totale de l'aquifère circulant à travers la formation géologique des grès à Voltzia, à l'aplomb du forage EST433, a été évaluée à 180 g.L^{-1} (Landrein et al., non publié ; ANDRA). Les modélisations PhreeqC, effectuées au BRGM dans le cadre de cette thèse et réalisées à partir des données minéralogiques et géochimiques, ont permis d'estimer les salinités totales des eaux porales contenues dans les échantillons de roches issus des passes K2-18 et K2-17 respectivement de l'ordre de 365 et 100 g.L^{-1} (tableau 20).

Tableau 20. Caractéristiques principales des échantillons du Trias étudiés.

Numéro des passes	K2-20		K2-19		K2-18		K2-17
Température mesurée in-situ ^b	>60->66		60-66		57-65		55-60
Teneur en eau (%) ^c	5 - 10		3 - 15		4		<1
Salinité totale (g.L ⁻¹) ^d [fraction NaCl en g.L ⁻¹]	120*+		180*		365** [358,89]		100** [84,82]
Références ANDRA (EST)	31465	31467	31602	31603	31571	31572	31387
Profondeur forée (m)	1955,30/	1955,90/	1885,15/	1885,45/	1822,80/	1823,10/	1727/
	1955,60	1956,20	1885,45	1885,75	1823,10	1823,40	1727,30
Profondeur verticalisée (m) ^a	1934,80/	1935,40/	1865,40/	1865,70/	1803,70/	1804/	1708,90/
	1935,10	1935,70	1865,70	1866	1804	1804,30	1709,20
Porosité mercure (%)	18,40	nd	14,57	nd	8,06	nd	4,67
Lithologie	Couches intermédiaires		Grès à Voltzia		Couches rouges		Argile dolomitique
	Buntsandstein supérieur				Muschelkalk inférieur et moyen		Muschelkalk supérieur
Période géologique	Trias moyen						
	Aquifère				Aquitard		

^a Profondeur recalculée en tenant compte de la déviation de 8,3° considérée comme homogène sur toute la longueur du forage

^b Diagraphie thermique *in-situ*

^c Teneur en eau mesurée à 105°C à partir d'un échantillon représentatif du compartiment géologique ciblé

^d Salinité totale (g.L⁻¹) ; * mesure sur les eaux souterraines (ANDRA), ** approximation (ANDRA) et *** modélisations (PHREEQC) à partir de l'eau en équilibre avec la roche (BRGM)

nd : non déterminé

Aquifères et Aquitards

Les échantillons de roches sédimentaires originaires des quatre passes forées dans les compartiments du Trias moyen (K2-20, 19, 18 et 17) ont été classés en deux catégories distinctes en fonction de leur porosité et de leur teneur en eau (tableau 20).

Les importantes teneurs en eau, les quantités non négligeables d'eau libre, et les fortes porosités des carottes K2-20 et K2-19 ont permis d'assimiler ces faciès à des formations aquifères. Toutefois, des productivités différentes ont été détectées entre ces deux niveaux d'aquifères. A l'inverse, les carottes K2-18 et K2-17 ont été qualifiées d'aquitards. Les faciès de K2-17 et K2-18 appartiennent, au même titre que les formations évaporitiques et argileuses du Keuper et du Lias, à la couverture triasique de faible perméabilité qui a fourni à l'aquifère du Trias une bonne protection contre les infiltrations d'eau à partir de la surface ou d'aquifère productif plus superficiel comme celui situé dans le calcaire du Dogger (Marty et al., 2003). Dans ce compartiment « aquitard », les transferts diffusifs ont été supposés négligeables par l'équipe de Marty et al. (2003) sur une échelle de temps supérieure à plusieurs millions d'années. Cette hypothèse a été validée par Rebeix et al. (sous presse) qui n'a détecté aucune connexion locale entre les différents aquifères situés à l'aplomb du forage EST433. Ainsi, la recharge de l'aquifère du Trias du Bassin de Paris se déroulerait exclusivement dans les zones de failles et d'affleurement situées au niveau des Vosges et du Morvan (Celle-Jeanton et al., 2009; Marty et al., 2003).

Origines des fluides circulant dans le Trias

A l'aplomb du forage EST433, les fluides circulant dans l'aquifère du Trias, au niveau de la formation des grès à Voltzia, ont été caractérisés comme des eaux fortement salées (180 g.L^{-1}). Cette teneur est cohérente avec celles de Minoux (1967) retraçant l'évolution de la minéralisation des eaux du Trias dans le Bassin de Paris. En effet, les eaux du Trias sont très peu salées (inférieure à 1 g.L^{-1}) de la bordure orientale jusqu'à Nancy puis le deviennent fortement (300 g.L^{-1}) dans la Marne et enfin les teneurs en sels diminuent à 100 g.L^{-1} en région parisienne (Minoux, 1967). Matray et al. (1989) ont attribué cette forte salinité à la dissolution des évaporites (halite et sylvite) du Keuper, situées à l'Est, ainsi qu'à leur transport latéral vers le centre du bassin.

Selon Fontes et Matray (1993a), les eaux du Trias seraient le résultat d'un mélange d'une eau de mer extrêmement évoluée et d'une saumure secondaire dérivée de la dissolution d'évaporites des formations géologiques supérieures ou du socle permien par une eau plus récente d'origine continentale ou météoritique. Cette hypothèse a également été émise par Rebeix et al. (sous presse).

En effet, l'eau du Trias collectée au niveau du forage EST433 s'est révélée fortement chargée en chlorures (2579 mM) et en bromures (15 mM). La valeur du ratio Cl/Br de cette eau (Cl/Br = 167) se situe dans l'intervalle de valeurs correspondant à une saumure primaire (Fontes et Matray, 1993a) et les données $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^2\text{H}$ obtenues à partir de cette eau ont également suggéré une venue d'eau météoritique. En se basant sur les travaux de Celle-Jeanton et al. (2009), cette paléo-recharge pourrait être datée du quaternaire, et plus précisément de la période s'étendant de l'Holocène au Pléistocène. D'ailleurs, Marty et al. (2003) ont estimé à moins de 30000 ans la recharge de l'aquifère du Trias *i.e.* à la fin de la période glaciaire du Pléistocène. Une recharge des eaux du Trias en condition climatique froide a aussi été évoquée par Rebeix et al. (sous presse).

7. Contraintes naturelles du milieu apportées aux conditions expérimentales

Les différentes analyses minéralogiques et physicochimiques réalisées sur les carottes (passes) K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17 ont permis de caractériser ces roches sédimentaires profondes et d'initier une description de l'évolution des systèmes fluviaux initiateurs de leur formation. Ces travaux ont également permis de mieux appréhender les mécanismes de transferts et d'écoulement se déroulant au sein de ces compartiments triasiques profonds.

Les études microbiologiques ont porté sur quatre échantillons situés entre 1710 et 1935 m de profondeur et issus de ces quatre passes. D'un point de vue microbiologique, ces différents échantillons de roches sédimentaires profondes, que nous appellerons maintenant K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17 en rappel de leur passe d'origine, ont été considérés comme des environnements chauds, fortement salés et soumis à une pression importante (supérieure à 180 bars). Les faciès de nature gréseuse (K2-20 et K2-19) ont présenté des caractéristiques propices à la colonisation bactérienne. Le diamètre des pores, la perméabilité et le contenu en eau ont été jugés suffisants pour permettre le passage de microorganismes (Jenneman et al., 1985) et l'installation pérenne d'une communauté microbienne. Les formations argileuses (K2-18 et K2-17) ont, à l'inverse, montré des propriétés défavorables au développement microbien. En effet, aucune circulation d'eau n'a été détectée dans ces deux formations. Les teneurs en eau y sont faibles (K2-18) voire quasi inexistantes (K2-17). Enfin, le diamètre de leur réseau poral est si faible qu'il empêche la circulation de microorganismes de diamètre supérieur à 100 nm. Ces roches pourraient être comparées à des filtres bactériens naturels interdisant tout échange de communauté entre les aquifères du Trias et les compartiments géologiques supérieurs. Néanmoins, l'existence de microniches pouvant séquestrer des microorganismes ancestraux reste une possibilité.

Chapitre IV

Première partie :

**Investigations microbiologiques
préliminaires des formations
triasiques profondes à l'aplomb du
forage EST433 (Meuse/Haute Marne,
France)**

Comme précédemment développé dans la revue bibliographique (chapitre I), les récentes recherches menées sur les environnements de subsurface ont montré l'existence d'un monde microbien séquestré dans les roches et sédiments jusqu'à plus de 4000 m de profondeur. Dans de tels écosystèmes, l'accès à la fraction viable et cultivable de cette microflore est indispensable pour la compréhension de son rôle dans la géosphère profonde. Cependant, malgré un effort marqué pour développer de nouveaux milieux et méthodes d'enrichissement, notre capacité culturelle limitée rend difficile la définition de l'étendue de la diversité microbienne (Cragg et al., 1990; Joseph et al., 2003; Kaeberlein et al., 2002; Marteinson et al., 1997; Süß et al., 2004). Afin de s'affranchir de ces limitations, l'utilisation complémentaire des approches moléculaires basées sur l'extraction d'ADN environnemental s'est généralisée pour étudier la diversité de nombreuses communautés microbiennes endogènes des profondeurs et ainsi permettre l'exploration de ces écosystèmes encore largement méconnus.

Dans cette partie a été décrit le développement méthodologique réalisé afin d'aboutir à l'analyse et à l'identification de la communauté microbienne potentiellement endogène des formations sédimentaires terrestres profondes datant du Trias et considérées pauvres en biomasse. La réalisation des approches culturelle et moléculaire, menées en parallèle, sur les carottes de roches sédimentaires ainsi que sur divers témoins de contamination a permis de discriminer les bactéries potentiellement endogènes des compartiments géologiques de celles apportées au cours des différentes étapes de ce travail. De plus, afin d'obtenir une vision la plus exhaustive possible de la communauté bactérienne présente dans les compartiments géologiques profonds étudiés, plusieurs procédures d'extraction d'ADN ont été testées et évaluées en se basant sur la qualité des ADN environnementaux extraits et la richesse de la diversité mise en évidence.

1. Evaluation de la contamination dans les carottes de roche du Trias

Dans les environnements profonds, la contamination est principalement véhiculée par les fluides de forage circulant au cours des opérations de forage. Par conséquent, une estimation de l'intrusion des fluides de forage dans chaque carotte étudiée a été réalisée en utilisant les données géophysiques acquises au cours du forage et notamment, les profils RMN (TCMR et CMFF) et les courbes de résistivité (Battani, communication personnelle). Les faibles porosités et les teneurs en eau libre quasi nulles, visualisables sur les profils RMN, ont indiqué une très faible pénétration des fluides de forage dans les carottes de roche K2-17 et K2-18, estimée au maximum de l'ordre du cm pour les parties dolomitiques les plus poreuses de l'échantillon K2-17. De plus, pour ces mêmes roches, les

faibles diamètres des pores (inférieurs à 10 μm) mesurés par porosimétrie mercure (cf. chapitre III partie 1) ont agi comme des barrières naturelles interdisant toute contamination microbienne. Les données de mud-logging²³ correspondant aux compartiments géologiques inférieurs plus poreux, K2-19 et K2-20, ont montré des courbes de résistivité plutôt regroupées indiquant une faible pénétration des boues également de l'ordre du cm. Afin de s'affranchir des potentielles contaminations microbiennes originaires des fluides de forage et *a priori* restreintes au premier centimètre périphérique des carottes, l'étude de la diversité microbienne, pouvant être considéré comme endogène de ces formations, a été menée sur le cœur des carottes uniquement (voir p. 161 paragraphe 3.2).

Puisque les fluides de forage sont considérés comme le vecteur majoritaire de la contamination, les bactéries contenues dans ces derniers ont été recherchées par une double approche culturale et moléculaire. Bien que quelques colonies aient été isolées des fluides de forage à base d'huile (DFO) et d'eau (DFW) attestant de leurs non stérilité, la communauté microbienne cultivable était peu abondante et non quantifiable ($n < 50$ à la dilution $\frac{1}{2}$) (Ellis et al., 2003). De plus, aucune amplification positive ciblant le gène codant l'ARNr 16S bactérien n'a été obtenu pour les deux types de fluides de forage.

L'une des difficultés rencontrées lors des analyses moléculaires menées sur des environnements pauvres en biomasse est une interprétation biaisée de la communauté microbienne par la détection de séquences contaminantes (Barton et al., 2006; Gérard et al., 2009; Tanner et al., 1998). Par conséquent, une banque de contaminants, spécifique de cette étude, a été réalisée dans le but de discriminer la communauté microbienne potentiellement endogène de celle apportée lors des étapes de forage, de conditionnement et d'analyse. Ainsi, les isolats bactériens et les clones environnementaux considérés comme non endogènes ou potentiellement allochtones des échantillons étudiés ont été répertoriés à partir des fluides de forage et de divers témoins de contamination.

Lors de l'étape de pré-conditionnement sur site, toutes les colonies qui se sont développées sur les milieux exposés aux bioaérosols présents dans l'atmosphère de la BAG ont été isolées et identifiées par séquençage partiel du gène codant l'ARNr 16S bactérien. Ces témoins de contamination ont permis de recenser 14 espèces bactériennes différentes (notées C_x). Il en a été de même pour les UFC isolées des fluides de forage à partir desquelles 9 espèces bactériennes appartenant à 6 OTU distinctes ont été mises en évidence (tableau 21).

²³ Mud-logging : terme utilisé pour décrire l'ensemble des données récoltées lors d'un forage (analyses réalisées sur les carottes de roche et surveillance de différents paramètres tels que la présence de gaz, surveillance du niveau des bassins, longueur du train de tiges de forage utilisée, diagraphie des boues).

Afin d'établir des contrôles complémentaires sur les potentiels contaminants présents dans l'environnement du laboratoire et/ou dans les différents réactifs, kits et consommables utilisés, des amplifications ont été réalisées à partir des contrôles négatifs d'extraction (ou blancs d'extraction notés EB), *i.e.* à partir des extraits obtenus en réalisant les protocoles d'extraction d'ADN 2, 3 et 4 sans échantillons naturels, ainsi que des témoins négatifs d'amplification (notés AB). Aucune amplification directe du gène codant l'ARNr 16S bactérien n'a été obtenue à partir de ces différents contrôles (extraction et amplification). Cependant, certaines PCR nichées ont parfois généré de faibles amplifications. Ces amplicons ont révélé l'existence d'une faible contamination par de l'ADN bactérien lors des étapes d'extraction et/ou d'amplification de l'ADN. Ces produits issus des PCR nichées ont été analysés par DGGE et identifiés par séquençage. Sur l'ensemble des bandes DGGE analysées, 6 OTU ont été identifiés (tableau 21).

Les OTU constituant la banque de contaminants sont affiliées à des espèces bactériennes aérobies ou anaérobies facultatives distribuées entre les phyla des *Actinobacteria*, des *Firmicutes* et des *Proteobacteria*, avec notamment les trois classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* (tableau 21).

Les phylotypes cultivables identifiés dans les bioaérosols sont majoritairement apparentés à l'ordre des *Actinomycetales* et au phylum des *Firmicutes* avec les genres *Staphylococcus* et *Bacillus*. Le genre *Staphylococcus* ainsi que la plupart des *Actinomycetales* identifiés sont fréquemment rencontrés chez l'Homme indiquant le caractère allochtone de ces bactéries.

La communauté bactérienne des fluides de forage est principalement constituée d'*Alphaproteobacteria*, notamment des membres de la famille des Sphingomonadaceae mais également des genres *Bacillus* (*Firmicutes*) et *Massilia* (*Betaproteobacteria*). Les microorganismes appartenant à la famille des Sphingomonadaceae sont ubiquitaires. Bien que retrouvés chez l'Homme, ces procaryotes ont aussi été détectés dans des environnements oligotrophes tels que les salles propres d'assemblage des navettes spatiales (La Duc et al., 2007; Moissl et al., 2007; Novikova, 2004) ou encore l'eau potable (Williams et al., 2004) ainsi que dans les milieux marins en tant que symbiontes (Tabares et al., 2011) et dans les sols agricoles (Li et al., 2008). De plus, la présence de cette famille a été mise en évidence lors de l'isolement de bactéries thermophiles suggérant une potentielle capacité de survie aux températures élevées (GenBank AB618494). Les membres du genre *Methylobacterium* ont aussi été détectés dans des environnements propres du fait de leurs résistance aux fortes teneurs en chlore (Moissl et al., 2007). Les isolats DFO-AE11,5-1:2-1 et DFO-AE7-1:2-1 affiliés respectivement à *Bacillus halodurans* et *B. polygonii* sont des espèces alcalinophiles et halotolérantes voir halophiles, *B. polygonii* pouvant se développer en présence de 14% de NaCl (Aino et al., 2008). *B. halodurans* a été également

isolé dans une source chaude indiquant une thermotolérance de la souche (Hashim et al., 2004). Le dernier OTU le plus représenté parmi les isolats des boues de forage est apparenté au genre *Massilia*, genre aérobie très répandu dans la nature, détecté chez l'Homme et dans son environnement (Lindquist et al., 2003) mais également dans des sources chaudes terrestres (Lau et al., 2009) et dans des sols contaminés aux hydrocarbures aromatique polycyclique ou HAP (Zhang et al., 2010). Bien que les bactéries isolées des fluides de forage soient considérées comme des contaminants, les fluides de forage, de part leur contact avec les formations sédimentaires, pourraient également contenir des microorganismes endogènes des roches. En effet, lors de leur circulation dans le puits, les fluides de forage se chargent en particules minérales et en « eaux » de formations où se trouveraient potentiellement les microorganismes endogènes. Ainsi, la communauté microbienne des fluides de forage pourrait être considérée comme un mélange de communautés autochtones et allochtones. Seule la bactérie isolée des boues de forage à base d'huile (DFO) et affiliée au genre *Bacillus* a été attribuée strictement à de la contamination car cette souche a également été rencontrée dans la communauté des bioaérosols.

Les contaminants relatifs à l'environnement du laboratoire sont dominés par le phylum des *Proteobacteria* en particulier par les *Betaproteobacteria*, avec l'espèce *Delftia acidovorans* qui représentait la moitié des séquences analysées, et par la classe des *Gammaproteobacteria* avec les séquences affiliées à *Stenotrophomonas maltophilia*, bactérie également détectée et isolée de la communauté contaminante des bioaérosols.

Tableau 21. Distribution des phylotypes contaminants identifiés dans les différents contrôles négatifs.

Groupe phylogénétique	Isolats et bandes DGGE	Identités de séquence (blast)	Espèces bactériennes ou clones environnementaux apparentés (Numéros d'accèsion Genbank)	Environnements
<i>Actinobacteria</i>	C5a	100%	<i>Williamsia</i> sp. SY3 (EU073114)	Homme ⁽¹⁾ , sols
	C2	99%	<i>Micrococcus luteus</i> isolat D1-2T (AB617561)	Environnements hypersalés, Homme, sédiment marin profond
	C5b	99%	<i>Salinibacterium</i> sp. 18III/A01/077 (AY576726)	Homme, environnement marin
	C10e	99%	<i>Agrococcus jenensis</i> isolat AC72 (AJ717350)	Environnement alcalin, Homme, roches calcaires
	C4	98%	<i>Cellulomonas</i> sp. Asd M7A1 (FM955877)	Permafrost et sols glaciaires,
	C9, C10d	99%	<i>Microbacterium oxydans</i> (EU821338)	Marnes noires, sols, Homme
<i>Firmicutes</i>	CTRL-EB2d-3	100%	<i>Propionibacterineae</i> de la peau non cultivé ()	Homme
	C3	99%	<i>Paenisporosarcina macmurdoensis</i> souche GRT7 (F778709)	Permafrost, sols tempérés
	C6	100%	<i>Staphylococcus epidermidis</i> souche CIFRI H-TSB-12-ZMA (JF799903)	Eau de mer, sols, sédiments, Homme
	C10b, C10c	99%	<i>Staphylococcus</i> sp. MOLA 313 (AM945546)	Eau de mer, Homme, air
	C8	99%	<i>Bacillus</i> sp. PG-3-9 (JF820106)	Sols, roches ignées
	C12, C15, DFW-AE7-10 ⁻⁷ -3	99%	<i>Bacillus</i> sp. PG-2010-8 (FR746072)	Sols et sédiments
	DFO-AE7-1:2-1	99%	<i>Bacillus halodurans</i> souche FNP 135 (HM484173)	Aliments salés, sources chaudes, croute océanique
	DFO-AE11,5-1:2-1	99%	<i>Bacillus</i> sp. ISO_02_Chiprana (EU676882)	Roches gréseuses, produit de fermentation
	DFW-AE7-10 ⁻⁶ -1, DFO-AE7-10 ⁻⁶ -3	99%	<i>Aerococcus viridans</i> souche DSD-PW4-OH13 (HQ425688)	Homme, eau de mer
	DFW-AE7-1:2-1	99%	<i>Sphingobium</i> sp. bB5 (JF772521)	Sols, Homme

	DFW-AE7-10 ⁻⁶ -2	100%	<i>Sphingomonas</i> sp. MH57 (EU182885)	Eau potable, Homme
	DFW-AE7-10 ⁻⁴ -1, DFO-AE7-10 ⁻⁶ -1, DFO-AE7-10 ⁻⁶ -2	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. clone GI5-009-B0 (FJ192950)	Environnements propres, Homme, environnements marins
	DFW-AE7-10 ⁻⁷ -1	99%	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4 (CP001298)	Environnements contaminés au chlorométhane, environnements propres
<i>Betaproteobacteria</i>	CTRL-AB1	99%	<i>Ochrobactrum</i> sp. clone B224 (JF833622)	Sols, sédiments, bioréacteurs
	DFW-AE7-10 ⁻⁶ -3, DFW-AE7-10 ⁻⁷ -2, DFW-AE7-10 ⁻⁷ -4	99%	<i>Massilia</i> sp. I_Gauze_W_10_4 (FJ267553)	Homme, air, source géothermale, sols contaminé aux HAP
	CTRL-EBPd2	98%	<i>Burkholderiales</i> non cultivée, clone 5 (EU362134)	Sols, désert
	CTRL-AB2, CTRL-AB6, CTRL-AB1.1, CTRL-EB2d-1, CTRL-EB2d-4, CTRL-EB2d-5, CTRL-EB3-2, CTRL-EB3d-2, CTRL-EB3d-1, CTRL-EB3d-3.2	99%	<i>Delftia acidovorans</i> souche WR42 (JF700415)	Sols, boues activées, environnements marins (corail, croute océanique profonde), sédiments d'aquifère, roches
<i>Gammaproteobacteria</i>	C7a	99%	<i>Pseudomonas</i> sp. RKS6-8 (GQ477175)	Homme, sols et surface
	C10a	99%	<i>Acinetobacter</i> sp. sw-6-1 (HQ634940)	Tractus intestinal de poissons, eau, Homme
	C7b, C16, CTRL-AB3, CTRL-AB4, CTRL-EB4d-1, CTRL-EB4d-2, CTRL-EB3d-3.3, CTRL-EB3d-3.1	99%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> souche 6B2-1 (AY445079)	Plantes, Homme, eau de sources, lac, croute océanique jeune
<i>Bacteria</i>	CTRL-EB3-1	100%	Bactérie non cultivée clone 30-P1 (AB533955)	Milieu marin, sols

⁽¹⁾ Retrouvés chez l'Homme (peau, poumon, ...)

La communauté bactérienne des bioaérosols est indiquée par la lettre C. Les bactéries isolées à partir des fluides de forage sont désignées par la nomenclature DF (drilling fluid) suivie de O pour les boues à l'huile ou de W pour les boues à l'eau, du milieu d'isolement utilisé (AE7 pour milieu aérobie pH = 7 et AE11,5 pour aérobie pH = 11,5), de la dilution des boues de forage avant inoculation et enfin du numéro de l'isolat. Les contaminants détectés aux cours des contrôles complémentaires (CTRL-) ont été divisés en deux sous-groupes : les blancs d'amplification (AB) constitués des témoins négatifs des amplifications lors des PCR nichée et les blancs d'extraction (EB) précédés du numéro de protocole utilisé (2, 3 ou 4). Pour les EB, il est également indiqué si « l'extrait » a été dialysé (d).

2. Bactéries viables dans le cœur des carottes de roches

Les roches K2-17, K2-18, K2-19 et K2-20 ont fait l'objet d'une approche culturale diversifiée. En effet, un grand nombre de milieux d'enrichissement aérobies et surtout anaérobies a été réalisé en ciblant préférentiellement les métabolismes les plus fréquemment rencontrés dans les environnements profonds, *i.e.* la fermentation, la méthanogénèse et la réduction hydrogénotrophe et/ou hétérotrophe des composés soufrés. Les roches profondes du Trias appartenant aux environnements salés et hypersalés, les microorganismes halotolérants et halophiles (faibles, modérés et extrêmes) ont été recherchés. La composition de l'eau porale contenue dans les carottes K2-18 et K2-17 a également été modélisée sous PhreeqC afin de reproduire des conditions chimiques se rapprochant de celles rencontrée *in-situ*. Pour chaque milieu de culture, différentes températures d'incubation ont été testées afin de détecter la présence de procaryotes mésophiles, thermotolérants et thermophiles. Enfin, certains enrichissements ont été incubés à 150 bars dans le but de cultiver des microorganismes piézophiles stricts indétectables par une incubation conventionnelle à pression atmosphérique. En outre, l'une des originalités de l'approche culturale réalisée est basée sur l'utilisation de deux catégories d'échantillons pour lesquels les conditions de conservation et de stockage n'avaient pas été identiques. Après leur remontée à la surface, les carottes du Trias ont été soit conservées de manière traditionnelle à pression atmosphérique soit rapidement placés dans une enceinte haute pression (pressurisée à 190 bars) afin de préserver la potentielle communauté microbienne piézo-sensible.

Malgré plus de 400 enrichissements réalisés et une surveillance de plusieurs mois (jusqu'à 12 mois), aucun microorganisme cultivable n'a été détecté dans les quatre échantillons de roche extraits de compartiments géologiques situés entre 1700 et 2000 m de profondeur. Cette absence de croissance a été constatée par observations microscopiques et confirmé lors de suspicion de croissance, par colorations (coloration de Gram ou SYBR Green) et extraction d'ADN. Néanmoins, d'importantes croissances bactériennes ont été observées lors de l'incubation de souches connues (*Thermosipho japonicus*, *Petrotoga mexicana* et *Desulfovibrio profundus*) en présence des différentes roches, ce qui montre que les roches ne présentaient aucun caractère toxique et ne contenaient pas de substances pouvant inhiber le développement microbien.

L'absence de croissance microbienne observée dans les différents milieux d'enrichissement n'a donc pas été imputée à la nature chimique des roches. Il se pourrait que les milieux d'enrichissement utilisés au cours de ce travail n'aient pas été adaptés au développement des microorganismes

endogènes des formations (Harayama et al., 2004) bien que cette hypothèse soit peu probable aux vues du nombre et de la variété des milieux testés. Il est également possible qu'une faible et/ou lente croissance microbienne ait pu se produire mais que les quantités de biomasse soient toujours trop faibles pour être détectées par les outils et les méthodes actuels (Alain et Querellou, 2009; Parkes et al., 2000) ou encore qu'aucun des procaryotes présents dans les échantillons ciblés ne soit cultivable. Cette non-cultivabilité peut être expliquée soit par l'absence de cellules procaryotiques viables, soit par la perte de cultivabilité des microorganismes autochtones, occasionnée par exemple par un état de stress généré par la mise en culture *in-vitro*, par l'excavation et la dépressurisation des échantillons lors de la remontée des carottes à la surface (Alain et Querellou, 2009) ou par les conditions physico-chimiques extrêmes régnant *in-situ*, auquel cas les procaryotes seraient présents sous forme de spores et autres états de dormance. En effet, les données *in-situ* de température et de salinité correspondant à ces roches du Trias (cf. chapitre III partie 1, tableau 20) ainsi que les conditions réductrices présumées ont positionné les échantillons dans une zone relativement proche d'une zone de stérilité suggérée par Magot (source : Alazard et al., 2010) concernant les environnements pétroliers et que l'on pourrait étendre aux écosystèmes de subsurface. Par conséquent, l'absence de microorganisme cultivable dans les échantillons naturels du Trias est en accord avec les précédents échecs de culture obtenus à partir de divers écosystèmes de subsurface combinant température et salinité élevées. De plus, en prenant en compte les paléotempératures estimées, les compartiments du Trias auraient pu être soumis à des températures entre 75 et 95°C entraînant une paléostérilisation des formations sédimentaires et ainsi la disparition de toute trace de vie (Wilhelm et al., 2001). De plus, les conditions *in-situ* extrêmes (salinité, température) auraient empêché toute recolonisation du système.

3. Comparaison de méthodes d'extraction d'ADN environnemental à partir de formations sédimentaires profondes

A l'inverse de l'approche culturale, l'approche moléculaire permet de caractériser un écosystème en s'affranchissant des étapes de mise en culture et d'accéder à la communauté des incultivables et/ou des populations microbiennes rares et minoritaires présentes dans la géosphère. Bien qu'étant un outil puissant, l'approche moléculaire des environnements profonds s'est souvent heurtée aux faibles biomasses, rendant complexe l'accès au matériel génétique (Gérard et al., 2009 ; Poulain et al., 2008).

Quatre protocoles d'extraction d'ADN ont été testés afin d'acquérir (i) une méthode d'extraction d'ADN efficace sur différents types de roches sédimentaires profondes et (ii) une vision la plus

représentative possible des communautés microbiennes présentes en subsurface. Dans un premier temps, les protocoles d'extraction d'ADN ont été comparés et des essais d'optimisation ont été réalisés sur la base d'un seul échantillon, la carotte K2-20. Dans un second temps, les protocoles efficaces ont été reproduits sur les trois autres carottes K2-19, K2-18 et K2-17.

Dans ce travail, les mêmes lots d'échantillons de roche réduits en poudre ont été utilisés dans le but de réduire l'hétérogénéité spatiale de distribution des microorganismes au sein des carottes et ainsi de pouvoir comparer la biodiversité mise en évidence pour chaque méthode d'extraction directe d'ADN.

3.1. Primo-évaluation des méthodes d'extraction à partir d'une formation gréseuse profonde

L'efficacité de quatre méthodes d'extraction directes d'ADN a été testée sur l'échantillon K2-20 car cet échantillon naturel de roche est originaire du compartiment géologique considéré comme le plus favorable à la croissance et à la colonisation microbienne du fait de sa porosité, de sa perméabilité, permettant la circulation de fluide dans l'encaissant, et de la présence d'eau libre dans la formation (cf. chapitre III partie 1). Les échantillons de roches pulvérisées ont été classés en deux groupes distincts en fonction des parties étudiées de la carotte K2-20 : le cœur (K2-20i) et la périphérie de la carotte (K2-20p). La périphérie de la carotte K2-20 a été utilisée pour la majorité des essais d'optimisation dans le but de ne pas diminuer la quantité déjà limitée d'échantillon K2-20i disponible.

Le protocole 1, développé spécifiquement pour l'extraction d'ADN à partir d'environnements argileux consolidés profonds (Néble et al., soumis) est basé sur (i) une désorption préalable des microorganismes endogènes et (ii) une saturation des potentiels sites de fixation de l'ADN néo-libéré. Ce protocole a été testé, dans un premier temps, sans ajout de lait dans le but de réduire les risques d'introduction de contamination par l'ajout d'additif. Le protocole 2 a été défini à partir de plusieurs procédures d'extraction d'ADN largement citées dans la littérature (Lerner et al., 2006; Tsai et Olson, 1991; Zhou et al., 1996). Le protocole 3 (FastDNA Spin kit for Soil) basé sur le procédé de bead-beating, a été développé spécifiquement pour les sols et a permis d'extraire l'ADN de nombreux environnements profonds (Gérard et al., 2009; Orphan et al., 2001; Reed et al., 2002; Takai et al., 2001b; Webster et al., 2003). Enfin, le protocole 4 (UltraClean Mega Soil DNA), également développé pour l'extraction d'ADN à partir de sol, a donné de bons résultats à partir de sédiments marins profonds (Luna et al., 2006; Lunau et al., 2005) et de roches volcaniques (Herrera et Cockell, 2007). Chaque protocole d'extraction a permis l'obtention d'ADN bruts et d'ADN purifiés, par purification des ADN bruts sur colonne ou par dialyse.

Dans cette étude, aucun des protocoles d'extraction directs n'a permis de récupérer une quantité suffisante d'ADN environnemental pour être détectée sur gel d'agarose coloré au BET. Néanmoins, la présence et la qualité de l'ADN environnemental extrait par chaque méthode ont été contrôlées par l'amplification d'un long fragment (plus de 1,4 kb) du gène codant l'ARNr 16S bactérien. Sur les deux amorces 1406R et 1492R antisens décrites comme universelles du domaine *Bacteria*, seule l'amorce 1492R, combinée à l'amorce sens universelle Fd1deg, a conduit à des amplifications positives.

Seuls les protocoles 2 et 3 ont généré des amplifications positives à partir des ADN bruts. En revanche, des amplicons ont été produits dans 3 cas sur 4 à partir des ADN purifiés (tableau 22). En effet, pour les ADN environnementaux extraits à l'aide du protocole 4, seul l'extrait purifié par dialyse a donné lieu à une amplification, indiquant la présence de substances inhibitrices des réactions PCR dans l'extrait d'ADN brut et non l'inefficacité de l'extraction. Il est admis que les extraits d'ADN environnementaux contiennent des inhibiteurs de réaction d'amplification composés d'acides humiques et de divers ions. Certains ions ont un effet néfaste lors des réactions d'amplification en interférant avec l'activité de l'enzyme (Barton et al., 2006). Dans le cas des environnements faibles en biomasse, les faibles quantités d'ADN extraits augmentent la proportion de substances inhibitrices et réduisent encore les possibilités d'amplification. Dans le cadre du protocole 4, une purification par cassette de dialyse plutôt que l'utilisation d'un kit commercial de purification a été sélectionnée de manière à limiter les pertes aléatoires et parfois significative d'ADN liées au principe d'adsorption des molécules d'ADN sur les particules (silices, PVPP,...) des colonnes de purification (Miller et al., 1999; Ranjard et al., 1998). Cette méthode de purification a d'ailleurs été privilégiée par la suite. En outre, les extraits d'ADN dialysés se sont avérés adéquats pour générer des amplicons puis des profils de biodiversité par DGGE de bonne qualité (voir p.161 paragraphe 3.2) contrairement aux extraits bruts pour lesquels les profils ont été inexploitable.

Tableau 22. Récapitulatif des amplifications du gène codant l'ARNr 16S bactérien (amorces Fd1deg/1492R) à partir des extraits d'ADN obtenus par les quatre protocoles testés.

		Echantillons	Protocole 1 (Néble et al., soumis)	Protocole 2 (cette étude)	Protocole 3 (FastDNA Spin for Soil)	Protocole 4 (UltraClean Mega Soil DNA)
Produits PCR	ADN bruts	K2-20p	-	+	+	NA
		K2-20i	NA	+	+	-
	ADN purifiés	K2-20p	-	+	+	NA
		K2-20i	NA	+	+	+

NA : protocole non appliqué

Des amplicons ont toujours été produits à partir des ADN bruts et purifiés extraits par les protocoles 2 et 3. Des concentrations en produits PCR jusqu'à deux fois plus importantes ont été obtenues à partir des ADN extraits de la périphérie (K2-20p) par rapport à ceux extraits du cœur de la carotte (K2-20i) (figure 33). Ce résultat pourrait être expliqué par l'extraction d'une quantité plus importante d'ADN à partir de la périphérie de l'échantillon K2-20 et, par extrapolation, à la présence d'une biomasse plus dense en périphérie (zone de contact avec les fluides de forage et exposée aux manipulations ultérieures) qu'au niveau du cœur de la carotte de roche. En se basant sur cette hypothèse, ce constat peut également fournir une nouvelle indication en accord avec une contamination minimale voire une absence de contamination du cœur de l'échantillon K2-20.

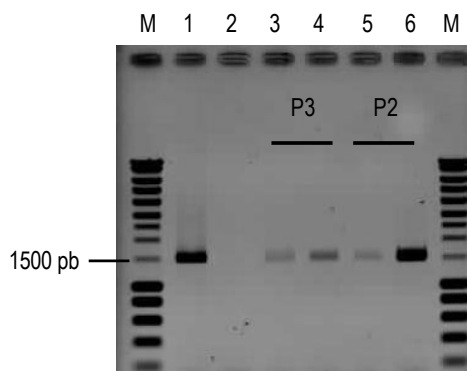


Figure 33. Amplification du gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN environnementaux bruts extraits par les protocoles 2 (P2) et 3 (P3) à partir du cœur et de la périphérie de la carotte K2-20. M, marqueur de poids moléculaire ; 1 : contrôle positif ; 2 : contrôle négatif (eau qualité biologie moléculaire) ; 3 et 5 : K2-20i et 4 et 6 : K2-20p.

Dans tous les cas, l'absence de bandes par simple dépôt direct des extraits bruts et les faibles amplifications obtenues à partir des extraits d'ADN K2-20i ont suggéré l'existence d'une faible biomasse

séquestrée dans cette formation sédimentaires située à 1935 m de profondeur dans la croûte terrestre. De précédentes études menées sur des écosystèmes similaires (roches) avaient rencontré des difficultés équivalentes, à savoir des quantités d'ADN environnementaux très faibles indétectables sur gel (Barton et al., 2004; Onstott et al., 2003; Zhang et al., 2005) et des amplifications de faibles intensités par PCR directes (Gérard et al., 2009).

Dans le but d'améliorer les rendements d'extraction et la représentativité de la biodiversité détectée, des essais d'optimisation ont été réalisés pour les procédures d'extraction 1, 2 et 3 en utilisant uniquement les parties périphériques de l'échantillon K2-20. De nombreuses études ayant mis en évidence une adsorption des molécules d'ADN néo-libérées sur les particules argileuses, calciques et quartziques d'échantillons naturels (Barton et al., 2006; Frostegard et al., 1999; Lorenz et Wackernagel, 1987; Saeki et al., 2010), un additif soit biologique (lait écrémé, protocole 1) (Volossiuk et al., 1995; Yuko et Naoyuki, 2004) soit synthétique (poly dIdC, protocole 1, 2 et 3) (Barton et al., 2006) a été ajouté avant la lyse cellulaire dans le but de masquer les potentiels sites de fixation de l'ADN présents dans les matrices environnementales. Différentes versions du protocole 2 ont été réalisées soit en éliminant l'étape de lavage préalable de l'échantillon (protocole 2W) soit en la remplaçant par une étape de désorption (protocole 2D). Enfin, dans le but de limiter la fragmentation de l'ADN lors de la lyse mécanique (Barton et al., 2006 ; Miller et al., 1999), la matrice de lyse disponible dans le protocole 3 a été éliminée et ainsi seules les particules minérales de l'échantillon ont été utilisées comme « matrice de lyse ».

Ici encore, les extraits d'ADN obtenus lors des différents essais d'optimisation n'ont pas été visualisables sur gel. De plus, alors que toutes les tentatives d'amélioration réalisées sur les protocoles 2 et 3 ont conduit à l'obtention de produits PCR, la plupart de celles tentées sur le protocole 1 se sont soldées par des échecs (tableau 23). Le protocole d'extraction 1 s'est donc révélé moins performant que les deux autres méthodes testées pour extraire l'ADN de l'échantillon K2-20p.

Tableau 23. Amplifications des extraits d'ADN obtenus lors des essais d'optimisation des protocoles d'extraction 1, 2 et 3 à partir de K2-20p. Les résultats ont été obtenus en utilisant le couple d'amorces w34FAM/w49.

	Essais d'optimisation	Amplifications
Protocole 1 (Néble et al., soumis)	Ajout de lait	-
	Ajout de poly dIdC	+(a)
	Diminution du temps de désorption	-
Protocole 2 (cette étude)	Ajout de poly dIdC	+
	Elimination de l'étape de lavage de l'échantillon (2W)	+
	Etape de désorption (2D)	+
Protocole 3 (FastDNA Spin for Soil)	Ajout de poly dIdC	+
	Elimination matrice de lyse	+
	Elimination matrice de lyse et ajout de poly dIdC	+

^(a) uniquement après purification

Dans notre étude, seul l'ajout de poly dIdC a mené à l'acquisition d'ADN amplifiable pour les trois procédures d'extraction (tableau 23) ainsi qu'à une légère augmentation des rendements d'amplification à partir de ces extraits d'ADN par rapport à ceux extraits sans additif (figure 34). Toutefois, ces effets ont été attribués à de la contamination après la découverte de traces d'ADN amplifiables dans la solution de poly dIdC utilisée malgré une exposition prolongée et répétée aux UV. Après passage en CE-SSCP des produits d'amplification obtenus à partir de la solution d'ADN synthétique, la contamination a été identifiée sous la forme d'un pic unique facilement discernable toujours localisé entre les positions 7160 et 7180 sur les chromatogrammes (voir p. 160, figure 36). Par conséquent, la présence d'ADN amplifiable et d'un pic en CE-SSCP a permis de justifier l'abandon de l'utilisation des poly dIdC lors des procédures d'extraction d'ADN.

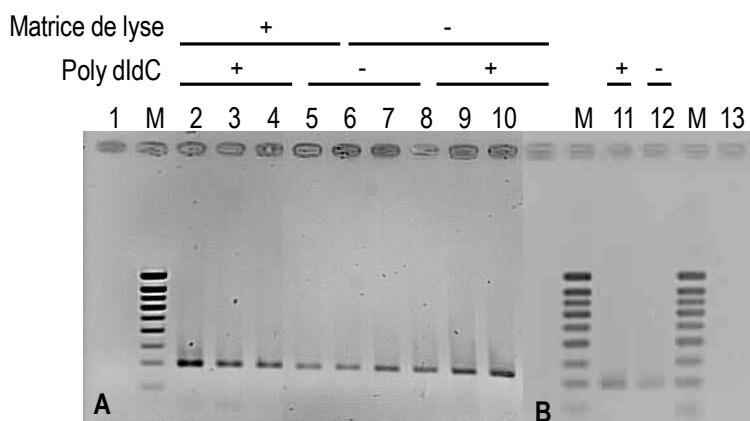


Figure 34. Amplification d'environ 200 pb du gène codant l'ARNr 16S à partir d'ADN environnementaux bruts extraits à partir de K2-20p à l'aide des protocoles d'extraction 3 (A) et 2 (B) en utilisant le couple d'amorce w34FAM/w49. M : marqueur de poids moléculaire ; 1 et 13 : témoins négatifs ; 2, 3 et 4 : protocole 3 avec poly dIdC ; 5 : protocole 3 ; 6 et 7 : protocole 3 sans matrice de lyse ; 8, 9 et 10 : protocole 3 sans matrice de lyse et avec poly dIdC ; 11 : protocole 2 avec désorption et ajout de poly dIdC et 12 : protocole 2 avec désorption (protocole 2D).

De plus, l'ajout de lait avant la lyse cellulaire réalisée dans le protocole 1, étape initialement présente dans la procédure de Nèble et al. (soumis), n'a pas abouti, dans notre étude, à une amplification positive. En outre, l'analyse moléculaire réalisée sur le lait écrémé utilisé a révélé la présence d'ADN amplifiable. En 2008, Ikeda et al. avaient estimé les quantités d'ADN contenues dans le lait écrémé commercialisé comprises entre 30 et 40 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poudre de lait. Barton et al. avaient déjà, en 2006, abandonné l'utilisation du lait lui préférant les molécules d'ADN synthétique lors de l'extraction d'ADN à partir d'échantillon naturel riche en calcium et pauvre en biomasse. Ainsi, l'absence de produits PCR générés à partir des ADN environnementaux extraits en présence de lait et le risque trop important d'introduire des contaminants dans les échantillons naturels par l'ajout de cet additif biologique a conduit à l'abandon de l'utilisation du lait pendant l'étape d'extraction d'ADN.

Dans le cadre des essais d'optimisation, l'ensemble des résultats décrits précédemment a permis d'abandonner l'utilisation du protocole d'extraction 1, inefficace sur l'échantillon K2-20, et de supprimer tout ajout d'additif, qu'il soit biologique ou synthétique. En d'autres termes, seules les procédures 2W et 2D ainsi que les versions alternatives des protocoles d'extraction 3 ont subi une analyse complémentaire plus approfondie afin d'en évaluer les bénéfices par rapport aux protocoles basiques. Par conséquent, des profils de diversité obtenus par CE-SSCP ont été générés à partir de chaque extrait dans le but de comparer de manière exhaustive la diversité détectée.

Les protocoles 2W et 2D ont été comparés au protocole d'extraction 2 basique. Ces trois versions ont été évaluées sur la complexité des communautés bactériennes totales détectées par CE-SSCP. La superposition des empreintes moléculaires a montré de fortes similitudes entre les structures des communautés bactériennes générées à partir des ADN environnementaux extraits à l'aide du protocole 2 avec lavage (2, vert) et sans lavage (2W, bleu) (figure 35). En effet, trois séquences bactériennes identiques ont été majoritairement détectées sur ces deux profils de diversité relativement simples. Un seul de ces trois pics a été obtenu sur le profil correspondant à l'ADN extrait par le protocole 2 avec désorption (2D, noire). L'extrait d'ADN 2W a fourni la communauté bactérienne la plus complexe avec la détection de 3 séquences bactériennes dominantes et de 4 voire 5 séquences plus faiblement représentées. Néanmoins, l'absence de certaines séquences minoritaires sur le profil de diversité 2 a été expliquée comme la conséquence de la dilution plus élevée des produits PCR issus de l'extrait d'ADN 2 avant leur passage en CE-SSCP.

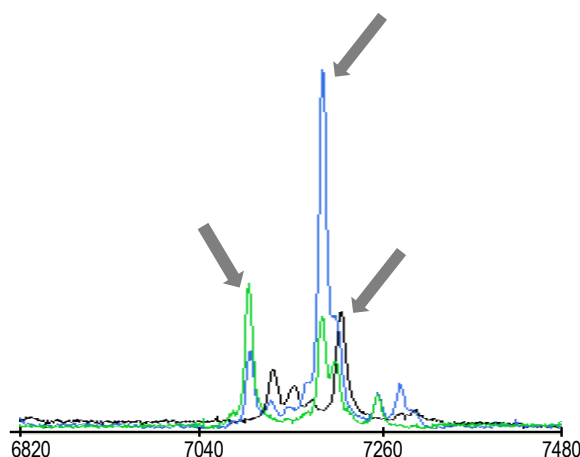


Figure 35. Structures des communautés bactériennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20p par le protocole 2 (basique avec une étape de lavage, en vert), le protocole 2W (sans lavage de l'échantillon, en bleu) et le protocole 2D (avec une étape de désorption, en noir). Un pic est considéré comme représentant une souche bactérienne. Les flèches indiquent les séquences bactériennes majoritairement détectées.

La structure de la communauté bactérienne obtenue à partir des ADN extraits avec les quatre versions du protocole 3 est présentée figure 36. Aucune modification significative des empreintes moléculaires n'a été mise en évidence par la suppression de la matrice de lyse. L'ajout d'ADN synthétique avant la lyse mécanique n'a également pas modifié la structure générale de la communauté bactérienne détectée à l'exception de la présence d'un pic supplémentaire préalablement identifié comme la contamination induite par l'ajout de poly dIdC. De plus, l'ajout de la matrice de lyse aux particules minérales grossières de l'échantillon n'a pas modifié le profil de diversité. L'induction d'une

fragmentation supplémentaire de l'ADN par l'ajout de cette matrice de lyse n'a pas pu être infirmée ou confirmée, l'ADN génomique n'étant pas détectable après extraction. Toutefois, les profils CE-SSCP réalisés au cours de cette étude étant basés sur l'amplification d'un fragment de petite taille (200 pb), ils n'ont donc été que très faiblement affectés par ce type d'altération de l'ADN.

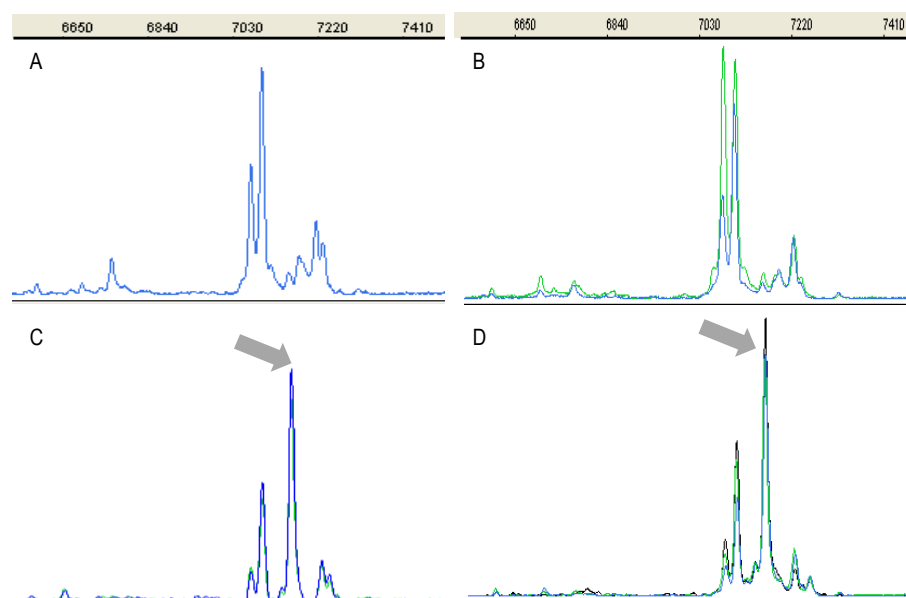


Figure 36. Structures des communautés bactériennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20p par les quatre versions du protocole 3. (A) en présence de la matrice de lyse uniquement, (B) en l'absence de la matrice de lyse, (C) en présence de poly dIdC et de la matrice de lyse, (D) en présence de poly dIdC et en l'absence de matrice de lyse. Les réplicats sont représentés par les différentes couleurs (bleu, vert et noir). Un pic est considéré comme représentant une espèce bactérienne. Les flèches indiquent la position de la séquence contaminante provoquée par l'ajout de poly dIdC.

Comme l'échantillon K2-20 contenait une faible biomasse, l'efficacité des différents protocoles d'extraction a été évaluée sur la capacité d'amplification des ADN environnementaux bruts et purifiés. De plus, une comparaison des profils de diversité a été réalisée dans le but de sélectionner, pour chaque protocole, la version permettant la détection de la communauté bactérienne la plus exhaustive. Par conséquent, trois protocoles d'extraction ont été retenus : les protocoles 2, 3 et 4, procédures pour lesquelles des produits d'amplification ont été obtenus. Dans le cas des protocoles 2 et 3, le choix s'est porté sur les formats basiques des procédures d'extraction étant donné que des profils de diversité fortement similaires (protocole 2, figure 35) voire reproductibles (protocole 3, figure 36) ont été générés à partir des diverses versions testées. Une étape supplémentaire de purification par dialyse a également été réalisée sur chaque extrait d'ADN brut.

3.2. Comparaison de la biodiversité détectée dans les quatre compartiments du Trias

Extraction et amplification d'ADN environnementaux

Du fait de leurs efficacités avérées sur l'échantillon K2-20, les protocoles d'extractions directes d'ADN 2, 3 et 4 ont été reproduits sur les échantillons K2-19, K2-18 et K2-17. Les différents ADN environnementaux, extraits à partir de 5 g de roches issues uniquement du cœur de chaque carotte, se sont révélés indétectables sur gels d'agarose. Des amplifications ciblant le gène codant l'ARNr 16S bactérien ont été menées sur chaque ADN environnemental obtenu soit après extraction (ADN brut) soit après dialyse des extraits bruts. Seuls 3 extraits d'ADN bruts sur 12 ont conduit à des amplifications positives alors qu'après dialyse, 9 de ces mêmes extraits ont permis l'obtention de produits PCR (tableau 24). Les réactions d'amplifications menées à partir des ADN environnementaux purifiés extraits des deux formations sédimentaires K2-18 et K2-17 avec le protocole 2 et de la formation K2-17 avec le protocole 3 ont donné des résultats d'amplification aléatoires non reproductibles. En d'autres termes, alors que certaines réactions ont permis la production d'amplicons, une absence de produits PCR a été constatée dans d'autres cas et ce pour des réactions d'amplifications réalisées dans des conditions identiques et ciblant les mêmes ADN extraits. Des quantités très faibles d'ADN cibles, inférieures à celles extraites des échantillons K2-19 et K2-20, pourraient expliquer ce résultat. En effet, les échantillons K2-18 et K2-17 étant des roches peu poreuses, la structure des roches est peu favorable au développement microbien (cf. chapitre III partie 1) et par conséquent, ces roches contiendraient des densités cellulaires inférieures à celles séquestrées dans les roches K2-19 et K2-20. De plus, la texture des roches influence l'efficacité d'extraction, les molécules d'ADN s'adsorbant facilement sur les particules argileuses (Frostegard et al., 1999). Par conséquent, la nature argileuse des roches pourrait diminuer l'efficacité d'extraction des protocoles 2 et 3 alors qu'elle n'influerait que faiblement sur l'efficacité du protocole 4. Ainsi, en plus de la qualité, la quantité d'ADN environnemental extrait impacterait directement sur la reproductibilité des résultats d'amplification. Néanmoins, l'ensemble des résultats récapitulés dans le tableau 24 a confirmé l'intérêt d'ajouter une étape de purification par dialyse de l'ADN brut aux procédures d'extraction d'ADN dans le but d'acquérir des extraits d'ADN de qualité suffisante pour poursuivre les analyses de biodiversité par des méthodes PCR dépendantes.

Tableau 24. Amplifications des extraits d'ADN obtenus par différents protocoles en ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S bactérien en utilisant le couple d'amorces Fd1deg/1492R.

	Echantillons	Extraits	Protocole 2	Protocole 3	Protocole 4
			(cette étude)	(FastDNA Spin for Soil)	(UltraClean Mega Soil DNA)
Produits PCR	K2-20i	ADN brut	+	+	-
		ADN dialysé	+	+	+
	K2-19i	ADN brut	-	+	-
		ADN dialysé	+	+	+
	K2-18i	ADN brut	-	-	-
		ADN dialysé	+/- (a)	+	+
	K2-17i	ADN brut	-	-	-
		ADN dialysé	+/- (a)	+/- (a)	+

(a) non reproductible

Afin de vérifier si les amplifications obtenues à partir des ADN dialysés n'étaient pas imputables à l'augmentation de la quantité d'ADN cible (les ADN dialysés étaient dix fois plus concentrés que les ADN bruts), les extraits d'ADN bruts ont été concentrés (dix fois également) par précipitation à l'isopropanol et à l'acétate de sodium 3M à pH 5,2. Les réactions d'amplification à partir de ces ADN bruts concentrés n'ont pas permis d'améliorer les rendements d'amplification confirmant l'utilité de la dialyse dans notre étude (figure 37).

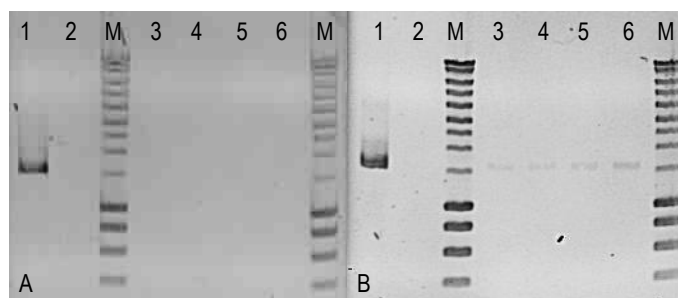


Figure 37. Efficacité de l'amplification PCR du fragment de gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN environnementaux concentrés bruts (A) et dialysés (B) extraits des quatre échantillons naturels étudiés avec le protocole d'extraction 4. M : marqueur de poids moléculaire ; 1 : contrôle positif d'amplification ; 2 : contrôle négatif d'amplification ; 3 : échantillon K2-17 ; 4 : échantillon K2-18 ; 5 : échantillon K2-19 et 6 : échantillon K2-20.

Une investigation de la diversité archaéenne a également été entreprise à partir des mêmes extraits d'ADN environnementaux mais n'a pas donné de résultats positifs dans la majorité des cas et ce, en testant différentes combinaisons d'amorces. Des produits d'amplification ont été uniquement obtenus à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20 et après PCR nichée en ciblant un fragment d'environ 170 pb. Les profils de diversité obtenus par CE-SSCP ont révélé la présence d'une communauté très simple composée au maximum de deux pics (figure 38). En se basant sur ces résultats, il semblerait que les compartiments géologiques terrestres profonds étudiés soient principalement colonisés par les membres du domaine *Bacteria*, les *Archaea* ne constituant qu'une fraction minoritaire de la communauté microbienne. Par conséquent, la suite de l'étude a été focalisée sur la diversité de la communauté bactérienne uniquement.

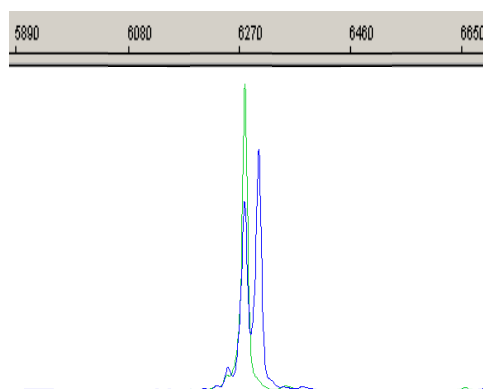


Figure 38. Structures des communautés archaéennes totales obtenues à partir des ADN environnementaux extraits de l'échantillon K2-20i par les protocoles d'extraction 2 (profil vert) et 3 (profil bleu). Un pic est considéré comme représentant une espèce.

La détection de bandes de faibles intensités par réactions PCR directes a été en accord avec la présence d'une biomasse faible. Le comptage cellulaire direct en utilisant des intercalants de l'ADN avec fluorochromes, tels que le DAPI ou l'acridine orange, a été infructueux. Pour les échantillons présentant une forte affinité pour les colorants usuels de l'ADN et une forte autofluorescence, en particulier les échantillons gréseux, la détection de cellules microbiennes et la distinction de ces dernières des particules minérales ont été impossibles. Gérard et al. (2009) avaient également abouti à la même conclusion à partir d'environnements riches en carbonates et présentant une densité cellulaire extrêmement faible par comparaison avec celles retrouvées dans des échantillons provenant d'une mine très profonde d'Afrique du Sud (Onstott et al., 2003) et de roches continentales granitiques et métamorphiques profondes (Pedersen et al., 2008; Zhang et al., 2005) estimée entre 10^2 et 10^4 cellules par gramme de roche.

La nature chimique et la texture des échantillons naturels (Barton et al., 2006; Carrigg et al., 2007; Dequiedt et al., 2011; Frostegard et al., 1999; Herrera et Cockell, 2007; Zhou et al., 1996) mais également la taille et l'activité des communautés microbiennes étudiées (Bertrand et al., 2005; More et al., 1994 ; Parkes et al., 2000; Webster et al., 2003) influencent l'efficacité et les rendements d'extraction. Dans le cas des environnements terrestres profonds, les faibles densités cellulaires constituent l'un des facteurs limitant la récupération d'ADN (Gérard et al., 2009; Poulain et al., 2008). Dans le cadre de ce travail, l'utilisation de procédures d'extraction directes a été justifiée par (i) de meilleurs rendements d'extractions obtenus dans des études précédentes sur divers types de sols (Boivin-Jahns et al., 1996; Herrera et Cockell, 2007; Roh et al., 2006; Tien et al., 1999), (ii) une meilleure représentativité des communautés microbiennes que celles obtenues avec des techniques d'extractions indirectes (Carrigg et al., 2007; Luna et al., 2006; Roose-Amsaleg et al., 2001), (iii) la lyse de microorganismes protégés au sein des matrices consolidées (Herrera et Cockell, 2007; Wade et Garcia-Pichel, 2003) et (iv) une récupération d'ADN extracellulaire (Agnelli et al., 2004; Ogram et al., 1987).

Comparaison des profils DGGE

La technique de DGGE a été la technique privilégiée dans la suite de cette étude. En effet, cette méthode a permis d'une part, d'obtenir une vision globale de la diversité procaryotique majoritaire présente dans chaque échantillon naturel de roche et extraite en fonction des différentes méthodes utilisées et d'autre part, d'accéder directement aux séquences de gènes codant l'ARNr 16S composant la communauté bactérienne. Par conséquent, en plus d'avoir une représentation de la structure de la communauté microbienne, une identification des espèces colonisant l'écosystème a également été réalisée.

Tout d'abord, les profils de diversité générés à partir des trois procédures d'extraction d'ADN ont été comparés. Les produits PCR nécessaires à la réalisation des profils DGGE ont été obtenus par PCR nichées du fait des faibles quantités d'ADN environnementaux extraits à partir des formations sédimentaires profondes et de l'utilisation d'une amorce clampée riche en GC diminuant les rendements d'amplification. En effet, les amplifications directes à partir des extraits d'ADN dialysés se sont révélées infructueuses dans la majorité des cas en utilisant le couple d'amorces 341F-GC /907Rc. En outre, deux à quatre produits d'amplification ont été mélangés pour obtenir une quantité suffisante d'ADN nécessaire à l'acquisition d'une empreinte moléculaire de diversité par DGGE. En 2003, Webster et al. avaient montré que l'association de plusieurs amplicons permettait, en plus d'augmenter les quantités

d'ADN, l'obtention d'un produit PCR plus représentatif de la communauté bactérienne d'un échantillon en particulier pour les études menées à partir d'extraits d'ADN faiblement concentrés.

Ainsi, des profils DGGE ont été obtenus pour chaque échantillon à partir des trois protocoles d'extraction d'ADN et ont montré l'existence de communautés bactériennes peu diversifiées mettant en évidence un maximum de 14 bandes par piste (figure 39). Cette diversité limitée est en adéquation avec les conditions drastiques régnant dans les compartiments géologiques étudiés. En effet, une biodiversité faible a été détectée dans différents environnements extrêmes tels que les sources géothermales (Reysenbach et al., 2000), les eaux de production des réservoirs pétroliers chauds (Li et al., 2007) ou encore les milieux fortement salés et roches évaporitiques (Oren, 1999).

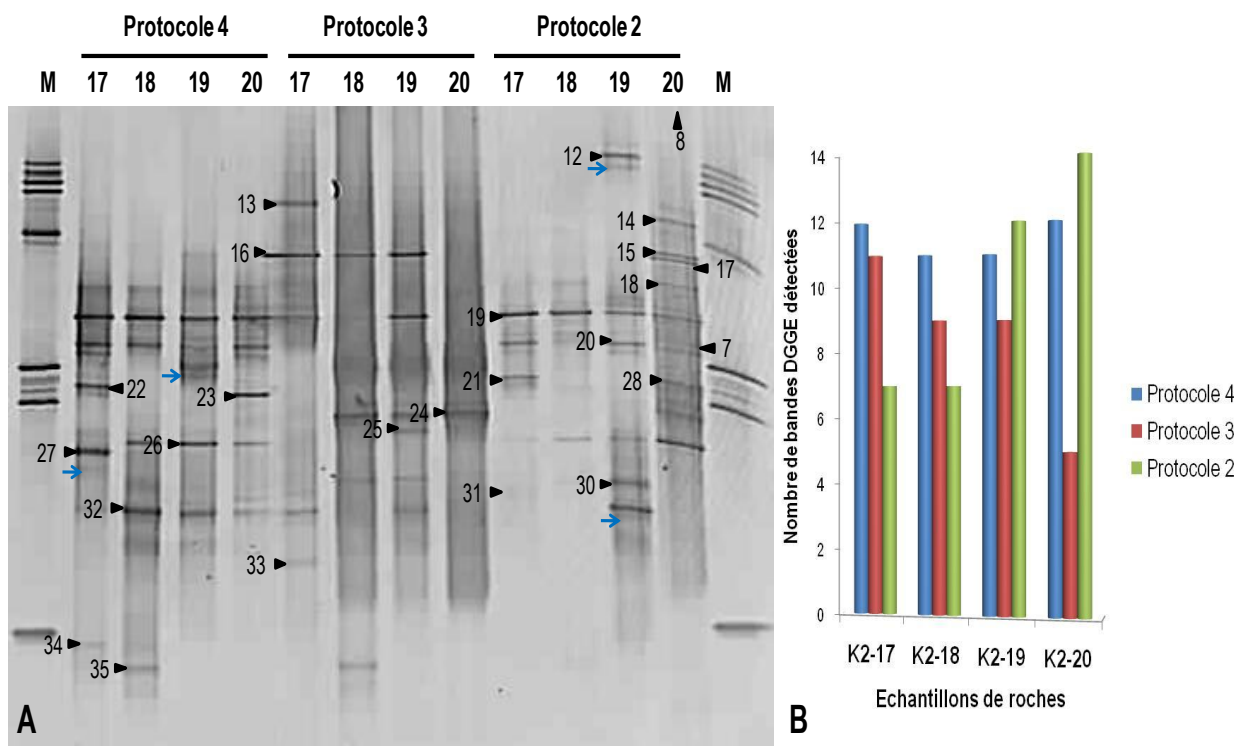


Figure 39. Diversité de la communauté bactérienne majoritaire détectée par DGGE à partir des ADN environnementaux dialysés extraits des quatre compartiments géologiques profonds avec les protocoles 2, 3 et 4. A : Profils DGGE. Une bande est considérée comme représentant une séquence bactérienne. Chaque flèche noire indique la position d'une bande DGGE excisée utilisée dans l'analyse de la diversité de la communauté bactérienne majoritaire à partir des ADN environnementaux dialysés extraits des quatre compartiments géologiques profonds avec les trois protocoles d'extraction. Les flèches bleues indiquent les bandes minoritaires non séquencées détectées uniquement sur un profil. M : Standard de mobilité. B : Richesse de la diversité détectée en fonction du protocole d'extraction d'ADN utilisé et de l'échantillon.

En fonction des protocoles d'extraction utilisés, la diversité mise en évidence pour un échantillon donné a été différente d'un point de vue quantitatif, en terme de nombre de bandes, mais également qualitatif en terme de position de migration de ces bandes. Dans notre étude, les bandes migrant à des positions identiques présentent des séquences nucléotidiques similaires à plus de 99% et sont donc considérées comme identiques. Le plus grand nombre de bandes ($n = 14$) a été trouvé dans la roche gréseuse K2-20, compartiment géologique le plus profond et le plus poreux étudié, traitée avec le protocole d'extraction 2. Paradoxalement, le profil le plus pauvre ($n = 5$) a également été retrouvé pour la formation K2-20 mais cette fois ci traitée avec la procédure 3 (figure 39). Les protocoles 2 et 3 n'ont donc pas extrait la même diversité à partir de l'échantillon K2-20. Cette observation a été constatée pour les quatre autres échantillons extraits à l'aide des trois procédures d'extraction d'ADN. Par exemple, pour l'échantillon K2-18, la diversité mise en évidence par le protocole d'extraction 2 était moins importante que celle du protocole 3, elle-même inférieure à celle de la procédure 4 en terme de richesse de diversité (figure 39B). Une diversité moindre a également été détectée à partir de l'ADN extrait de l'échantillon K2-17 à l'aide du protocole 2. De précédentes études avaient également montré que le choix de la méthode d'extraction influençait significativement l'accès à la communauté microbienne et de ce fait les résultats sur la composition de la structure de la communauté microbienne détectée (Carrigg et al., 2007; Luna et al., 2006; Martin-Laurent et al., 2001). Dans cette étude, le protocole 4 a été la procédure d'extraction directe d'ADN ayant permis de détecter la plus large diversité.

Certaines bandes DGGE, *i.e.* souches bactériennes, ont été exclusivement détectées à partir d'un seul ADN environnemental (flèches bleues, figure 39A). Par exemple, la bande 12 ainsi que deux autres bandes (flèches bleues) du profil de diversité de l'échantillon K2-19 extrait à l'aide du protocole 2 ont été strictement détectées sur ce profil. Il en a été de même pour les bandes 27 et 34 détectées uniquement à partir du profil de diversité de l'échantillon K2-17 extrait avec le protocole 4, pour une bande minoritaire détectée sur le profil de l'échantillon K2-19 extrait avec la procédure 4, pour la bande 33 du profil de l'échantillon K2-17 extrait avec la procédure 3 ou encore pour les bandes 14, 15 et 17 du profil de diversité de la roche K2-20 obtenus avec la méthode d'extraction 2. La détection de bandes uniques a ainsi montré l'intérêt d'utiliser plusieurs protocoles d'extraction dans le but d'obtenir une représentation plus exhaustive de la diversité présente dans un échantillon naturel. La diversité mise en évidence par les trois protocoles d'extraction s'est révélée complémentaire pour chaque échantillon. Luna et al. (2006) avaient aussi remarqué que la combinaison de plusieurs procédures d'extraction réduisait les biais d'estimation de la diversité lors d'une étude menée sur les sédiments marins profonds.

Des similitudes ont également été constatées entre les profils de diversité d'un même échantillon extrait avec différentes méthodes et entre les profils de diversité des quatre échantillons. Concernant l'échantillon K2-18 uniquement, la bande DGGE 35 du profil de diversité du protocole 4 a également été observée sur le profil de la procédure 3 suggérant une spécificité de l'espèce bactérienne pour l'échantillon K2-18. Au contraire, des bandes DGGE plus ubiquitaires (par exemple les bandes 18 et 19) ont été retrouvées sur la majorité des profils de diversité générés au cours de ce travail. En outre, la comparaison de multiples expériences de DGGE réalisées à partir des mêmes extraits d'ADN a permis de vérifier la reproductibilité des empreintes moléculaires.

Analyses statistiques

Afin de mieux appréhender les potentielles relations pouvant exister entre les diversités obtenues à partir des différentes procédures d'extraction d'ADN et les formations sédimentaires profondes étudiées. Deux analyses statistiques, par analyses en composantes principales ou ACP, ont été réalisées. L'une a porté sur les données physico-chimiques des roches (figure 40) et l'autre sur l'intensité relative des bandes DGGE composant les profils de diversité des quatre échantillons de roches en fonction de chaque procédure d'extraction (figure 41). Seules les premières projections ont été présentées.

L'analyse en composantes principales des données physico-chimiques des quatre roches sédimentaires profondes a permis une différenciation des roches en fonction de deux axes principaux expliquant 91,05% de la variabilité des données (Figure 40). La séparation des échantillons selon l'axe 1 est fortement corrélée à la CEC, à la salinité et aux teneurs en carbone organique lixiviable. Selon cet axe 1, trois écosystèmes ont pu être déterminés d'après leurs teneurs en sels : le premier composé uniquement de l'échantillon K2-18 a été assimilé aux environnements hypersalés proches de la saturation, le second avec l'échantillon K2-19 aux milieux hypersalés et enfin les échantillons K2-20 et K2-17 ont constitué le dernier niveau avec des salinités moindres. L'axe 2 de l'ACP est, quant à lui, régi par les pourcentages de silice et de quartz composant les échantillons, la porosité, les concentrations en bromures et en chlorures et, dans une moindre mesure, par les teneurs en eau et le diamètre poral maximal. Globalement, l'axe 2 a permis une différenciation des échantillons en fonction de leur structure et de leur texture. La répartition des quatre formations sédimentaires sur l'ACP a permis de classer les échantillons en deux groupes selon l'axe 2. Les échantillons K2-19 et K2-20, formant le premier groupe, ont été assimilés à des formations poreuses à composantes quartzitiques importantes dont la granulométrie grossière permettait la présence voire la circulation d'une quantité d'eau non négligeable

(figure 40B, ellipse bleue). A l'inverse, les échantillons K2-18 et K2-17 ont été identifiées comme des roches de textures fines (figure 40B, ellipse jaune). Dans des travaux antérieurs, la texture des échantillons a été déterminée comme l'un des facteurs ayant un impact significatif sur l'efficacité de la lyse cellulaire au cours des procédures d'extractions directes d'ADN (Carrigg et al., 2007). D'un point de vue physico-chimique, les quatre échantillons sont ainsi apparus très différents les uns des autres ; or acquérir une méthode d'extraction d'ADN efficace sur des échantillons de natures différentes est peu aisée.

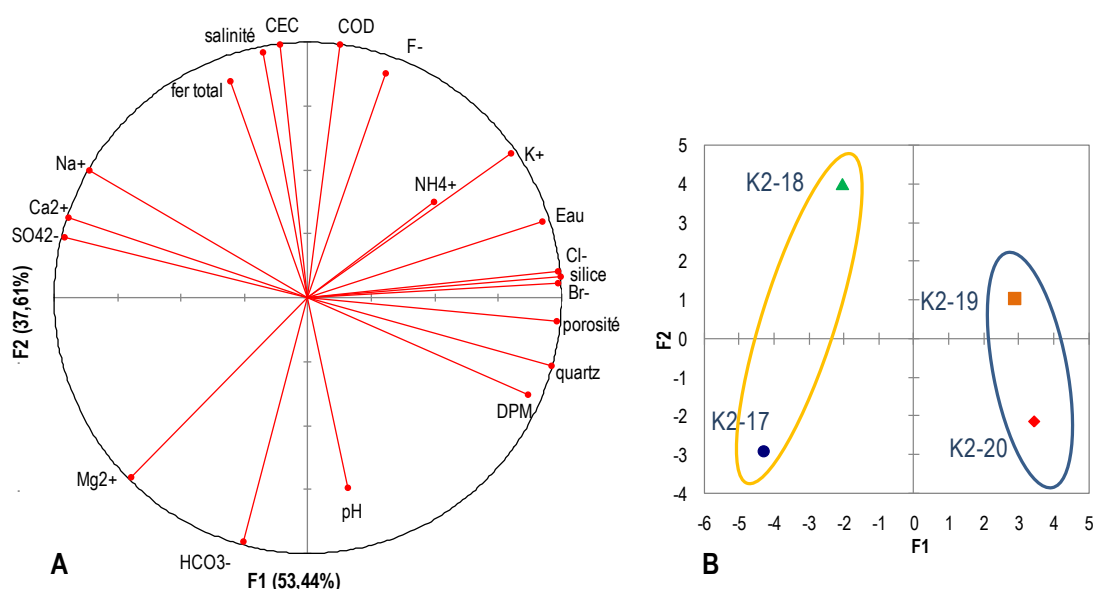


Figure 40. A. Cercle de corrélation de l'ACP établissant une matrice de corrélation entre les différentes caractéristiques physicochimiques des formations sédimentaires profondes. B. Analyse en composantes principales des quatre roches sédimentaires profondes étudiées. COD : carbone organique dissous, CEC : capacité échangeuse de cations, DPM : diamètre poral maximal, Eau : Teneur massique en eau déterminée à 150°C. Les concentrations en potassium (K+), chlorure (Cl-), bromures (Br-), magnésium (Mg2+), sulfate (SO42-), calcium (Ca2+), sodium (Na+) et bicarbonates (HCO3-) ont été déterminées par lixiviation des roches.

Une diversité bactérienne quasiment identique a été constatée entre les roches K2-17 et K2-18 extraites avec le protocole 2 (figure 41B). Cette méthode s'est avérée moins efficace pour extraire la diversité des échantillons K2-18 et K2-17 que les protocoles 3 et 4 (figure 39B). En contrepartie, la diversité bactérienne détectée pour les échantillons K2-20 et K2-19 extraits à l'aide de ce même protocole s'est avérée différente l'une de l'autre (figure 41B) et les profils DGGE correspondant ont été également les plus diversifiés. Une diversité bactérienne similaire a été mise en évidence entre des

échantillons K2-18 et K2-19 appartenant aux environnements les plus salés extraits avec la procédure 3 (figure 41A). En outre, cette méthode s'est révélée être la plus efficace à partir de l'échantillon K2-17, échantillon contenant la plus forte concentration en Mg^{2+} . Seul le protocole d'extraction 4 a permis d'extraire une diversité spécifique pour chaque roche. Cette analyse statistique a montré qu'en fonction du protocole d'extraction utilisé, une variation dans la biodiversité mise en évidence pour chaque échantillon était observable.

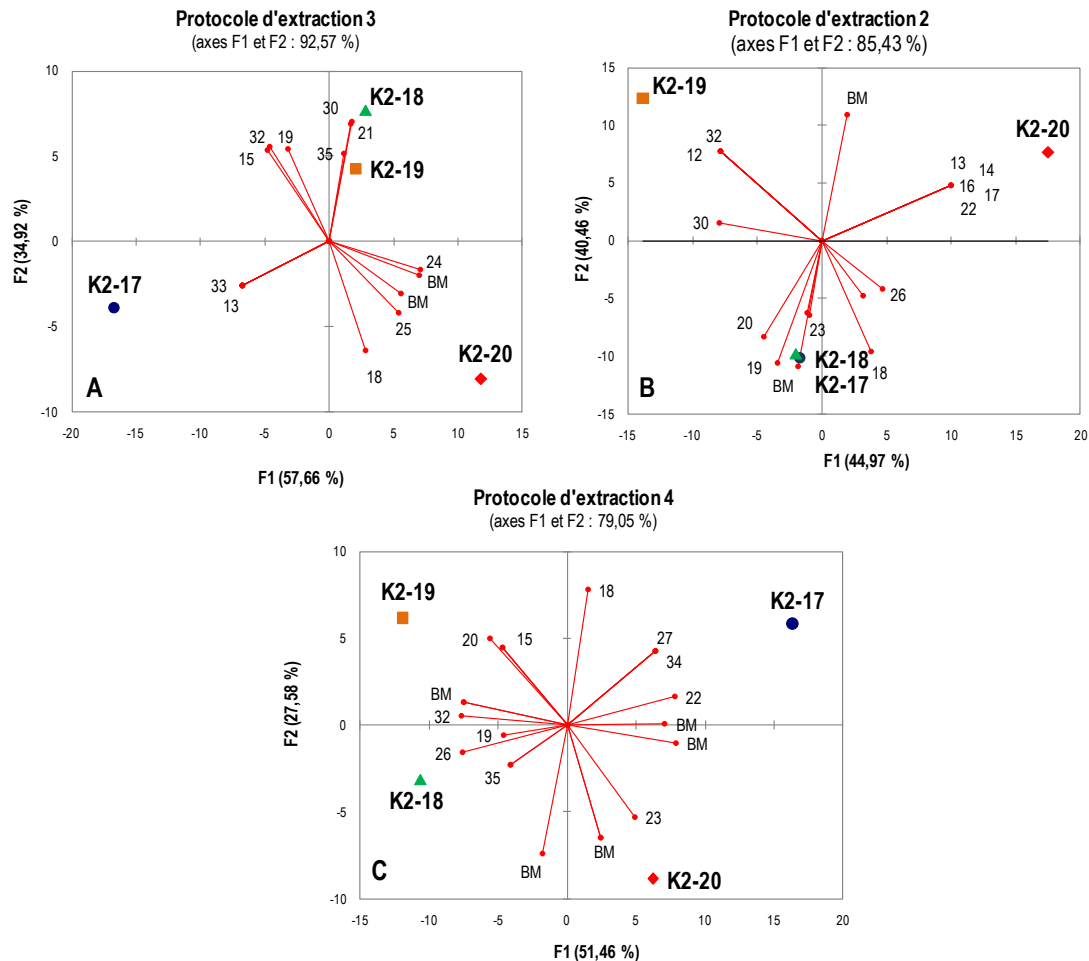


Figure 41. Analyse en composantes principales de la diversité bactérienne détectée par DGGE pour les quatre échantillons de roches sédimentaires profondes en fonction de chaque protocole d'extraction. Les projections impactant sur la variabilité des données sont associées aux bandes DGGE séquencées, utilisées par la suite pour établir la phylogénie, ainsi qu'à certaines bandes minoritaires non séquencées (BM).

3.3. Composition des communautés bactériennes des formations géologiques profondes du Trias

L'analyse de la diversité des membres du domaine *Bacteria* a été réalisée à partir des profils de diversité obtenus par DGGE pour les quatre roches sédimentaires profondes (K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17). Cette investigation a été entreprise à partir des différents profils de diversité générés par les trois protocoles d'extraction afin d'acquérir, pour chaque échantillon, une représentation plus exhaustive de la communauté bactérienne majoritairement présente.

Le séquençage de 24 bandes DGGE sélectionnées selon leur profil de migration a permis l'identification de 18 OTU distinctes (figures 42 et 43). L'analyse phylogénétique des séquences d'ARNr 16S a révélé la présence d'une communauté bactérienne inattendue dans de tels environnements terrestres profonds, chauds et salés. En effet, bien que les compartiments géologiques étudiés soient considérés comme anoxiques, des taxons mésophiles aérobies et anaérobies facultatifs ont été majoritairement détectés. Néanmoins, la plupart d'entre eux ont été affiliés à des clones environnementaux et/ou des isolats bactériens retrouvés dans des écosystèmes profonds ou des milieux extrêmes. Si aucune indication n'est mentionnée dans le texte, les valeurs de similarité de séquence étaient supérieures ou égales à 98 % par Blast, *i.e.* supérieure à celle définissant la limite de l'espèce fixée à 97 % (Wayne et al., 1991).

Plus de la moitié des séquences analysées (15/24) ont été affiliées au phylum des *Proteobacteria* et plus particulièrement aux classes des *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* (figure 42).

Parmi les 10 séquences associées aux *Betaproteobacteria*, 9 sont réparties au sein de 7 OTU distinctes regroupées sous l'ordre des Burkholderiales et composés des genres *Ralstonia* (bande DGGE 16), *Delftia* (bande DGGE 19), *Massilia* (bandes DGGE 17 et 18), *Curvibacter* (bandes DGGE 21 et 28), *Burkholderia* (bande DGGE 15), *Aquabacterium* (bande DGGE 26) ainsi que d'un clone (bande DGGE 7) présentant 96 % de similitude de séquence avec les genres *Undibacterium* (Eder et al., 2011) et *Herminimonas* (Muller et al., 2006). La dernière OTU de la classe des *Betaproteobacteria* est apparentée à l'espèce *Methylophilus methylotrophus* (bande DGGE 14).

La classe des *Alphaproteobacteria* est constituée de 3 séquences, 2 appartenant au genre *Mesorhizobium* (bandes DGGE 24 et 25) et une affiliée à l'ordre des Rhodobacterales (bande DGGE 27) et présentant 97 % de similarité de séquence avec l'espèce *Rubellimicrobium aerolatum*, bactérie isolée de l'air (Weon et al., 2009).

Les bandes DGGE 20 et 22 ont été apparentées respectivement aux espèces *Shewanella algae* et *Stenotrophomonas maltophilia* de la classe des *Gammaproteobacteria*.

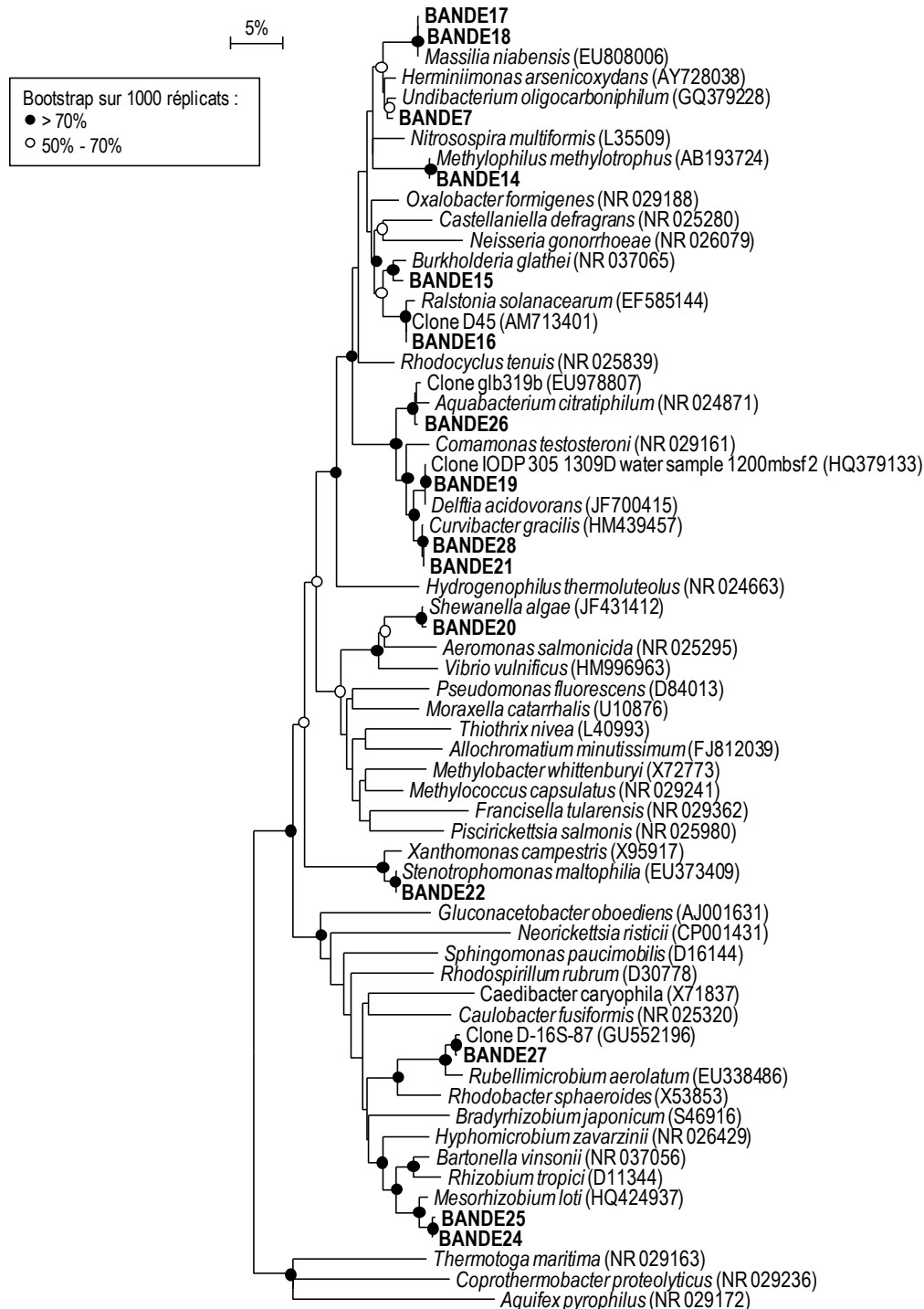


Figure 42. Arbre phylogénétique représentant la position au sein des *Proteobacteria* des séquences d'ARNr 16S issues des bandes DGGE. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Juke et Cantor sur 1000 bootstrap. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées. La barre d'échelle indique 5 substitutions pour 100 nucléotides.

Ensuite, 5 séquences ont été affiliées au phylum des *Actinobacteria* (figure 43) et, plus précisément, à l'espèce *Propionibacterium acnes* (bandes DGGE 30, 31, 32, 33) et à différentes espèces du genre *Rhodococcus* (bandes DGGE 34 et 35) comme *R. boritolerans*, *R. erythropolis* ou encore *R. globerulus*. Enfin, les quatre dernières séquences ont été affiliées aux phyla des *Firmicutes* (bande DGGE 23) et des *Bacteroidetes* (figure 43). Le phylum des *Bacteroidetes* est composés de 3 OTU différentes apparentées aux genres *Porphyromonas* (bande 13) et *Elizabethkingia* (bande 8) et seulement 97% avec le genre *Mucilaginibacter* (bande 12), nouveau genre bactérien isolé de l'eau d'une zone humide en Corée (Baik et al., 2010). La bande DGGE 23 présentait 91 % de similarité de séquence avec celle du premier microorganisme cultivé, la bactérie BPC-C1/31-1 isolée d'une formation argileuse profonde (Poulain et al., 2008).

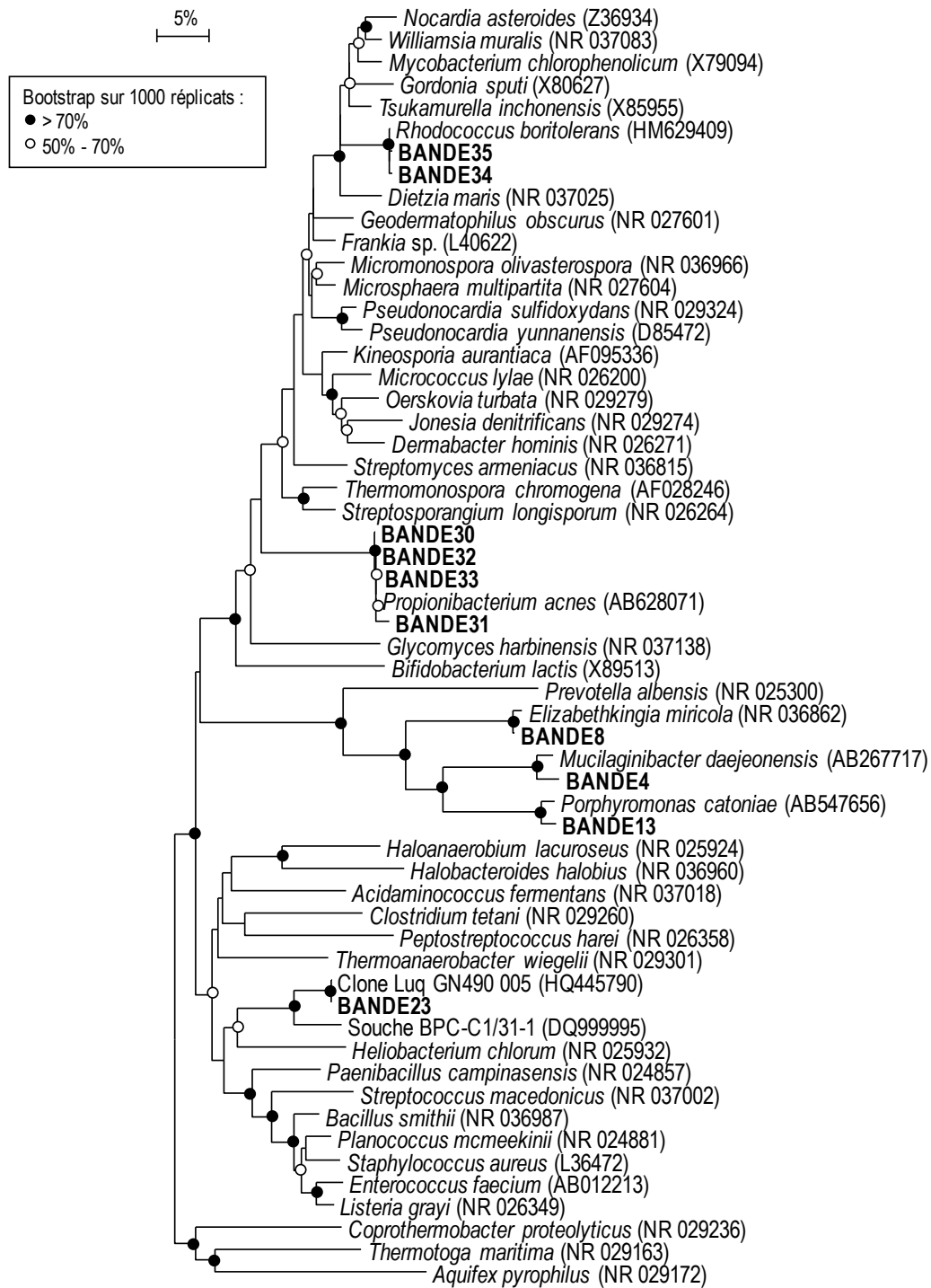


Figure 43. Arbre phylogénétique représentant la position des séquences d'ARNr 16S issues des bandes DGGE au sein des *Bacteria* hors *Proteobacteria*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Juke et Cantor sur 1000 bootstrap. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées. La barre d'échelle indique 5 substitutions pour 100 nucléotides.

Le but de cette étude étant d'aboutir à l'identification de la communauté bactérienne endogène des formations sédimentaires terrestres profondes datant du Trias, le caractère autochtone des phylotypes détectés a été évalué d'après la banque de contaminants réalisée au cours de cette étude mais également en fonction des données disponibles dans la littérature.

Les séquences affiliées à celles de clones et d'isolats répertoriés dans la banque de contaminants ont été considérées comme de la contamination. Par conséquent, les séquences affiliées aux espèces *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia* et au genre *Massilia* ont été considérées, pour la suite de l'étude, comme allochtones des formations sédimentaires profondes étudiées. De plus, l'espèce *Propionibacterium acnes* et les bactéries apparentées aux genres *Porphyromonas* et *Elizabethkingia* étant des microorganismes communément détectés chez l'Homme et dans les environnements cliniques, ces bactéries ont également été considérées comme des contaminants.

Ainsi, seuls les OTU détectés dans le cœur des carottes de roche, absents de la banque de contaminants et non affiliés aux communautés microbiennes fréquemment retrouvées chez l'Homme ont été considérés comme endogènes. Ces phylotypes, apparentés uniquement aux phyla des *Firmicutes* et des *Proteobacteria*, ont été détectés par ailleurs dans des formations sédimentaires et des roches basaltiques mais également dans divers environnements extrêmes.

Les clones environnementaux les plus proches de l'OTU appartenant aux *Firmicutes* ont été retrouvés dans des réservoirs pétroliers (Yamane et al., 2008), dans des sols hyperarides (Connon et al., 2007), dans des environnements hydrothermaux (GenBank EU419139) ainsi qu'au niveau du site d'Hanford, site de production de matières radioactives aux Etats Unis (HM187344) ou encore associé à des formations saprolitiques²⁴ profondes (GenBank HQ445790). Cette séquence a été uniquement retrouvée dans l'échantillon K2-20.

L'OTU apparentée au genre *Mesorhizobium* a également été détecté dans l'eau d'un aquifère (GenBank FJ204462), dans des coraux (GenBank FJ930449) et dans des environnements froids comme les environnements océaniques abyssaux (Eløe et al., 2011), un lac en Antarctique (GenBank AB630707) ou encore associés aux énigmatiques vers marins *Xenoturbella bocki* collectés dans le détroit de Skagerrak entre la mer du Nord et la mer Baltique (Kjeldsen et al., 2010). Dans cette étude, les séquences affiliées au genre *Mesorhizobium* ont été principalement retrouvées dans les formations aquifères (K2-19 et K2-20).

²⁴ Saprolite : roche résultant de l'altération chimique d'une roche-mère, due à l'action du climat, de l'eau ou l'action hydrothermale, sans avoir été transportée. Friable, elle présente les structures de la roche d'origine et de nouvelles structures. Il s'agit d'un matériau autochtone formé sur place.

L'OTU affilié à l'espèce *Shewanella algae* est associé aux environnements marins et a été retrouvé dans des sédiments marins profonds situés à plus de 2000 mètres de profondeur (GenBank HQ876210) suggérant une potentielle capacité de survie de cette espèce aux hautes pressions. D'ailleurs, les espèces *Shewanella violacea* et *S. benthica* ont été décrites comme des souches piézophiles (Nogi et al., 1998).

Enfin, au sein de la classe des *Betaproteobacteria*, les membres apparentés au genre *Burkholderia* ont été isolés de sédiments datant du Miocène (Elhottová et al., 2006), d'environnements chauds (GenBank HQ851074) et de sols contaminés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Morimoto et al., 2008). Certains de ces isolats se sont avérés utiles dans la dégradation des HAP, comme par exemple l'espèce *Burkholderia glathei* (Wilson et al., 2003), suggérant une aptitude à la survie par consommation de matière organique fossile. Les espèces bactériennes aérobies méthylophiles du genre *Methylophilus* ont été retrouvées dans des environnements salés comme le lac salé de Chaerhan en Chine (GenBank HM127009) ou des sédiments marins (GenBank GU362946) mais également dans le lac subglacial de Vostok (Christner et al., 2006). Certains isolats de ce genre se sont également révélés capables de dégrader les HAP voire de se développer en utilisant du pétrole brut et de résister à différents métaux. De plus, ils semblaient également bien adaptés aux environnements froids (De Marco et al., 2004). Le genre *Curvibacter* a été détecté au niveau de l'interface croûte océanique basaltique - eau de mer (Santelli et al., 2008) et dans l'eau douce de surface (Glaeser et al., 2010). Les bandes DGGE 26 et 7 ont constitué deux OTU fréquemment isolés et détectés dans des milieux oligotrophes tels que l'eau potable (Eder et al., 2011; Kalmbach et al., 1999; Kämpfer et al., 2007) et les carottes de glace (Simon et al., 2009) ou encore dans des environnements arides (GenBank EU362134). L'OTU présentant 98 % de similarité de séquence avec celle d'espèces du genre *Aquabacterium* (bande 26) a été apparenté à des clones environnementaux retrouvés dans des déchets miniers uranifères (GenBank FM877655) et à des isolats capables de réduire le fer (GenBank FJ269052).

Un OTU particulièrement bien adapté et résistant aux conditions extrêmes a été considéré comme potentiellement endogène. En effet, l'OTU affilié à 97% à l'espèce *Rubellimicrobium aerolatum* a été associé aux communautés bactériennes des déserts arides et hyper-arides (GenBank FM209358 ; Chuvochina et al., 2011; Orlando et al., 2010). Il a également été détecté au niveau d'un environnement volcanique chaud (Portillo et Gonzalez, 2008) et dans des déchets solides composés de pétrole et de marne issus de l'industrie chimique (GenBank EF540401). Cet OTU a été détecté uniquement dans l'échantillon K2-17.

L'approche moléculaire basée sur les ADN bactériens n'a pas permis de statuer sur l'état métabolique des microorganismes détectés. Les molécules d'ADN amplifiées pourraient provenir de bactéries viables et métaboliquement actives mais incultivées dans les conditions actuelles ou bien de bactéries en dormance présentant une faible activité métabolique et un développement lent. Elles pourraient également provenir d'ADN fossiles contenus soit dans des cellules mortes entières soit libres dans l'environnement. Bien que les molécules d'ADN soient rapidement dégradées, après la mort cellulaire, par les nucléases et les divers processus chimiques d'oxydation et d'hydrolyse (Lindahl, 1993), une diminution de la sensibilité de l'ADN aux nucléases a été démontrée par Lorenz et Wackernagel (1987). Ce phénomène est lié à l'adsorption de l'ADN sur une matrice minérale. De plus, sous certaines conditions, les molécules d'ADN pourraient acquérir une stabilité accrue. Certains auteurs ont suggéré une pérennité de l'ADN sur plus de 10 millions d'années en conditions de dessiccation ou de haute salinité (Fish et al., 2002; Inagaki et al., 2005; Vreeland et al., 2000). Ces estimations contrastent avec les prédictions théoriques pour lesquelles les molécules d'ADN ne pourraient pas survivre plus d'un million d'années, même conservées dans les meilleures conditions, en l'occurrence un environnement froid permanent tel que le permafrost (Willerslev et Cooper, 2005).

Certaines séquences bactériennes qualifiées d'endogènes ou de potentiellement endogènes ont montré plus de 99% de similarité de séquence avec celles d'espèces qualifiées de modernes *i.e.* en interaction directe avec les biotopes actuels. Si ces séquences étaient réellement dérivées de l'ADN de bactéries « Triasiques », elles devraient présenter plus de 1% de divergence. Selon Gérard et al. (2009), l'ADN environnemental détecté serait plus moderne que la datation des roches et pourrait provenir de bactéries ayant vécu ou circulé (pour les zones aquifères) plus récemment, de l'ordre de quelques milliers d'années. A l'inverse, certains auteurs ont expliqué ces faibles divergences par la préservation des microorganismes et des traces d'ADN piégés dans les évaporites sur des temps géologiques. De ce fait, les microorganismes ancestraux auraient été préservés dans leurs états initiaux sans modification majeure de leurs matériels génétiques, conséquence de la non adaptation de ces derniers à leur environnement et des faibles fréquences de divisions cellulaires. Les environnements hypersalés constitueraient des milieux favorables pour la potentielle préservation de signatures biologiques (Grant, 1998 ; Fish et al., 2002). Toutefois, une contamination des évaporites par l'apport de microorganismes allochtones plus modernes aurait pu se produire lors de divers événements géologiques provoquant fractures et recristallisation (Fish et al., 2002). De plus, la circulation d'eau pourrait également transporter des microorganismes allochtones dans les formations aquifères traversées. Néanmoins, cette communauté procaryotique pourrait provenir soit de compartiments géologiques supérieurs soit des zones de recharge qui, dans notre étude, pourraient en partie dériver

de la fonte des glaces formées lors de la dernière glaciation du Pléistocène (Celle-Jeanton et al., 2009), il y a moins d'un million d'années. Ces microorganismes seraient alors originaires d'une époque plus récente mais somme toute éloignée de l'époque actuelle.

4. Conclusion

L'absence de bactérie viable et cultivable isolée à partir du cœur des différentes carottes et à l'inverse, les enrichissements positifs obtenus à partir des fluides de forage, les faibles quantités d'ADN extraits du cœur des carottes et la présence d'une faible diversité séquestrée dans le cœur des matrices environnementales ont été considérés comme des témoins attestant de la qualité des carottes de roches et ont permis de suggérer l'absence de contamination dans le cœur des différentes carottes après conditionnement (élimination de la périphérie et pulvérisation des échantillons). Bien que ces constatations aient fourni des données sur la non contamination du cœur des roches, ces résultats ont positionné l'étude dans une situation où aucune souche microbienne viable, endogène de l'un des compartiments sédimentaires ciblés, n'a été isolée et par conséquent, disponible pour mieux appréhender le rôle joué par les métabolismes microbiens dans les cycles géochimiques se déroulant en profondeur.

Les différentes expériences ont montré la difficulté d'obtenir un développement microbien par cultures d'enrichissement et d'extraire de l'ADN microbien à partir d'échantillons naturels originaires d'environnements terrestres profonds. Cette observation, relativement prévisible, peut être expliquée par les faibles densités cellulaires, indétectables par fluorescence, et les faibles activités métaboliques présumées des communautés microbiennes endogènes des roches ainsi que par la distribution hétérogène des microorganismes séquestrés au sein des roches. En se basant sur les travaux de Sammartino et al. (2003) menés sur l'argile du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute Marne, cette hétérogénéité liée à la distribution minéralogique existe de l'échelle micrométrique à l'échelle de la formation sédimentaire complète. Par conséquent, l'hétérogénéité de distribution combinée aux faibles biomasses ont complexifié l'approche culturelle ainsi que l'approche moléculaire.

L'extraction d'ADN à partir d'échantillons de formations sédimentaires consolidées profondes a constitué un véritable challenge. L'analyse moléculaire de la biodiversité contenue dans les environnements terrestres profonds a demandé l'acquisition de techniques d'extraction d'ADN efficaces. En outre, la rareté et la quantité limitée des échantillons ont naturellement conduit à l'évaluation de

l'efficacité de différentes procédures d'extraction et à l'optimisation de ces dernières avant l'analyse moléculaire approfondie des échantillons. Comme les extraits d'ADN étaient indétectables sur gel, la présence et la qualité des ADN environnementaux extraits ont été contrôlées par l'amplification des gènes codant les ARNr 16S. Trois procédures d'extraction d'ADN se sont avérées efficaces à partir des échantillons naturels prélevés de quatre formations sédimentaires profondes (K2- 17, K2-18, K2-19 et K2-20) aux caractéristiques physico-chimiques et aux structures distinctes. De plus, les ADN dialysés se sont révélés de meilleure qualité que les ADN bruts pour envisager la poursuite de l'analyse moléculaire par méthodes PCR-dépendantes (DGGE).

L'accès à la biodiversité contenue dans chaque échantillon de roche a nécessité l'utilisation des échantillons issus des trois méthodes d'extraction d'ADN efficaces. En effet, une diversité complémentaire a été constatée à partir des trois profils DGGE générés pour un échantillon donné *via* les trois procédures d'extraction. En outre, en fonction du protocole d'extraction utilisé, une biodiversité plus ou moins spécifique a été mise en évidence pour chaque type d'échantillon. Ainsi, les méthodes d'extractions d'ADN semblent influencer la diversité microbienne détectée. Cependant, le faible nombre d'échantillons et de protocoles d'extraction testés n'ont pas permis une généralisation de cette conclusion et des études complémentaires devront être réalisées dans ce sens. De plus, bien que la technique de DGGE soit robuste pour la détection des espèces majoritaires, une approche plus approfondie par banque de clones pourrait également être réalisée afin d'affiner les résultats portant sur la richesse et la structure de la biodiversité présente dans chaque compartiment géologique profond.

L'étude de la diversité microbienne majoritaire détectée dans le cœur des carottes K2-17, K2-18, K2-19 et K2-20 a mis en évidence une communauté majoritairement bactérienne composée de membres du domaine *Bacteria* inattendus dans ce type d'environnements profonds. En effet, des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs, reconnus, d'après la littérature, comme étant mésophiles et/ou adaptés aux écosystèmes froids ont été retrouvés alors que l'on s'attendait à une communauté procaryotiques en relation avec (i) les températures relativement élevées régnant *in-situ*, comprises entre 55 et 65°C, (ii) les fortes teneurs en sels et (iii) l'anaérobiose présumée. Néanmoins, les OTU considérées comme endogènes et potentiellement endogènes ont été affiliées à des environnements de subsurface ainsi qu'à divers écosystèmes extrêmes, où la disponibilité de l'eau sous forme liquide était faible (biotopes arides) et/ou le milieu était carencé en nutriments, nécessitant la mise en place de stratégie de survie compatible avec l'origine autochtone.

La découverte de cette communauté bactérienne surprenante présente dans les compartiments sédimentaires terrestres consolidés prélevés aux alentours de 2000 mètres de profondeur soulève de nombreuses questions portant sur l'état physiologique des microorganismes séquestrés, sur leur capacité adaptative ou encore sur leur origine. Afin de mieux appréhender la biodiversité des environnements terrestres profonds et les cycles biogéochimiques se déroulant *in-situ*, l'étude de formations similaires situées à des profondeurs comparables semble indispensable.

Chapitre IV

Deuxième partie :

**Caractérisation de la diversité
microbienne d'échantillons incubés
provenant des formations triasiques
profondes à l'aplomb du forage
EST433 (Meuse/Haute Marne, France)**

En complément des approches uniquement culturelles ou bien moléculaires, une méthode alternative, dont de nombreux succès ont été récemment rapportés en métagénomique, consiste en une étape de pré-culture (Bertrand et al., 2005 ; Elend et al., 2006 ; Daniel, 2005). L'un des avantages de cette technique est la potentielle augmentation du nombre de microorganismes capables de présenter les cibles génétiques attendues (Entcheva et al. 2001). Si l'on considère que les procaryotes autochtones des formations sédimentaires profondes possèdent des métabolismes lents ou encore qu'ils soient initialement présents sous différentes formes végétatives, l'approche culturelle seule ne semble pas suffisante pour permettre la détection d'organismes procaryotiques viables et actifs. Néanmoins, les faibles augmentations de densité cellulaire, indétectables par les outils optiques actuels, ainsi que la « revivification » de certains microorganismes induite par une étape de pré-culture pourrait potentiellement s'avérer une méthode alternative pour augmenter la quantité et la qualité des ADN environnementaux extraits de ce type d'écosystèmes profonds.

Dans notre étude, de nombreux enrichissements ont été réalisés à partir d'échantillons originaires des quatre carottes K2-20, K2-19, K2-18 ou K2-17 issues donc de formations sédimentaires profondes de natures différentes. Bien qu'aucun développement microbien n'ait été constaté dans l'ensemble de l'approche culturelle, les ADN contenus dans les matrices environnementales incubées ont été extraits et étudiés par une méthode d'empreinte moléculaire (DGGE). Seuls ceux extraits à partir de l'échantillon K2-20 ont été soumis à une analyse moléculaire approfondie, *via* plusieurs banques de clones, en comparant les diversités obtenues à partir des échantillons avec et sans étape de pré-culture.

1. Extraction et amplification des ADN

Les différents enrichissements ayant été inoculés, le plus souvent, à 10% m/v avec un échantillon de roche pulvérisée, une masse de 1 ou de 1,7 g de roche a été incubée respectivement dans les milieux d'enrichissements à pression atmosphérique et sous pression. Par conséquent, dans le cadre de cette étude, les extractions d'ADN environnementaux ont été réalisées à l'aide du kit commercial « FastDNA Spin Kit for Soil » (Bio 101) qui s'est révélé en adéquation avec les quantités d'échantillons disponibles. De plus, la biodiversité extraite à l'aide de ce protocole d'extraction d'ADN s'est avérée hautement reproductible au cours de l'étude précédente (cf chapitre III partie 2 paragraphe 3.1.). Enfin, l'utilisation de ce kit commercial a permis de réaliser un grand nombre d'extraction d'ADN en parallèle (n = 12) et en un minimum de temps (30 minutes).

Parmi la totalité des enrichissements disponibles, seuls certains ont été sélectionnés d'après les conditions de conservation des échantillons (inocula), les types trophiques ciblés (milieux d'enrichissement) et les conditions d'incubation les plus représentatives de l'approche culturale ainsi que des conditions environnementales *in-situ*. Pour chaque roche (K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17), les échantillons sélectionnés étaient composés de roches conservées à pression atmosphérique et sous pression, incubées ou non dans des milieux d'enrichissements ciblant les métabolismes fermentaires, méthanogènes/méthylotrophes et sulfato-réducteurs et dont les teneurs en sels étaient proches des salinités des formations sédimentaires profondes. Les échantillons de roche choisis ont été incubés pendant 6 et 9 mois à pression atmosphérique et pendant 2 et 4 mois sous pression. Seuls les milieux incubés à une température de 55°C, *i.e.* proche de la température *in-situ*, ont été analysés.

Aucun des ADN extraits n'a été directement visualisable sur gel d'agarose révélant une densité cellulaire très faible. Ce résultat a permis de suggérer soit un lent développement de la biomasse procaryotique présente soit une absence de croissance de la communauté microbienne séquestrée au sein des différentes roches.

Afin de contrôler la présence d'ADN dans les différents extraits obtenus, une amplification du gène codant l'ARNr 16S du domaine *Bacteria* a été réalisée à l'aide du couple d'amorces universelles Fd1deg/1492R (figure 44). Des produits d'amplification ont été générés à partir de nombreux extraits d'ADN. Néanmoins, certains extraits n'ont pas permis d'obtenir d'amplicons et cela a été notamment le cas pour les ADN extraits des échantillons conservés à pression atmosphérique et incubés sous pression où toutes les réactions d'amplifications n'ont pas été concluantes. Dans le cas des milieux d'enrichissement incubés sous pression, comme toutes les cultures ont été préparées simultanément, les échecs d'amplification ont mis en évidence l'absence de molécules d'ADN exogènes amplifiables dans les milieux d'enrichissement après autoclavage. Cette conclusion a été étendue à l'ensemble de la gamme de milieux de culture utilisée au cours de ce travail car l'environnement et les conditions de préparation et de stérilisation étaient identiques. Par conséquent, toutes les amplifications ont été associées strictement aux ADN contenus dans les échantillons naturels.

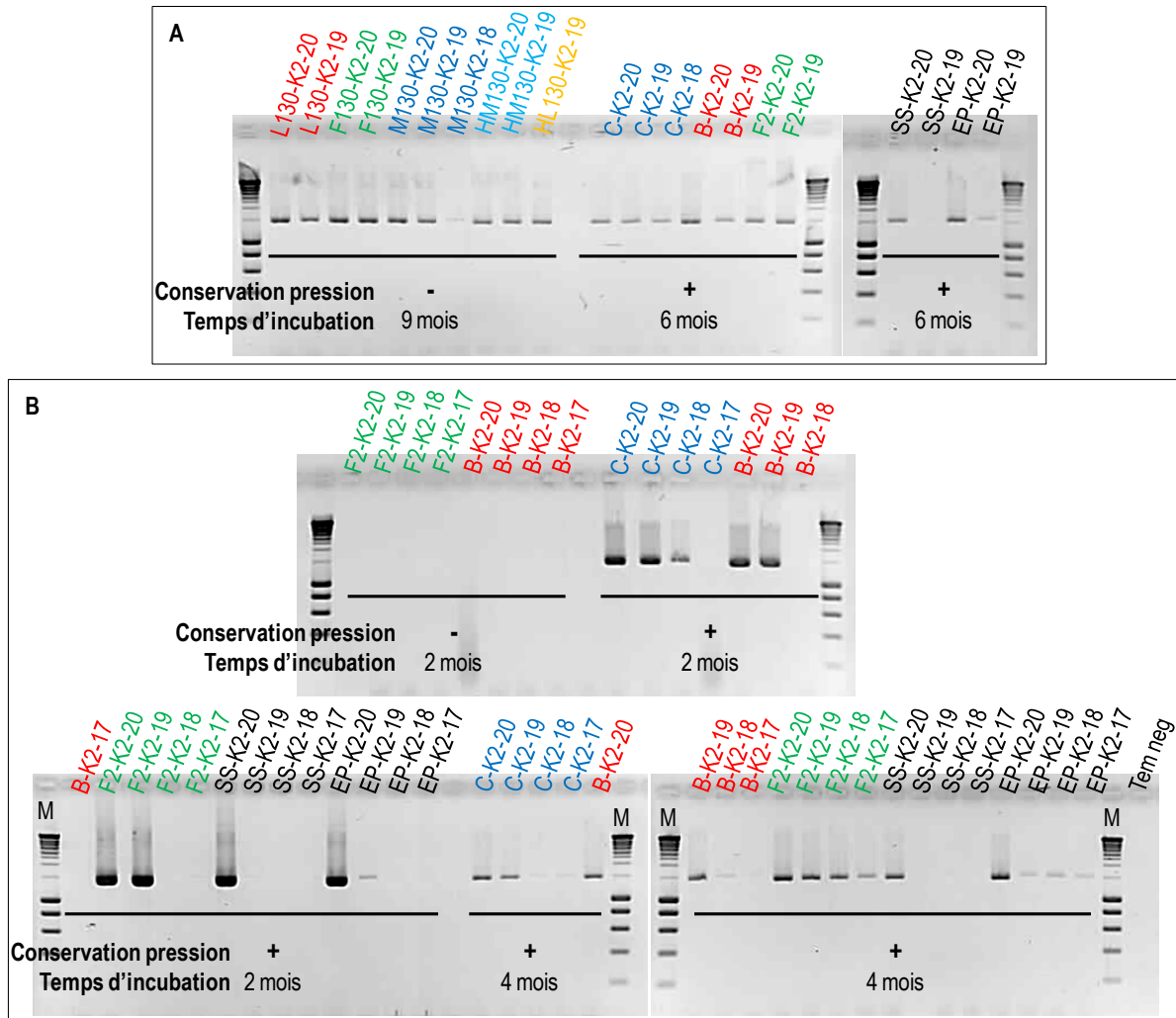


Figure 44. Amplifications du gène codant l'ARNr 16S à partir des ADN extraits des quatre carottes incubées à pression atmosphérique (A) et sous pression (B). L'intitulé des échantillons indique (i) le milieu artificiel utilisé pour cibler un type trophique particulier : L et B pour les BSR (en rouge et en orange les BSR hydrogénotrophes), M et C pour les méthanogènes/méthylotrophes (en bleu et bleu clair pour les méthanogènes hydrogénotrophes), F et F2 pour les fermentaires (vert) ou, pour les milieux SS et EP, les deux types de solutions salines ou eaux porales (en noir) et (ii) l'échantillon inoculé. Dans cette figure sont également présentés le mode de conservation (pression atmosphérique : - ; sous pression : +) et le temps d'incubation de l'échantillon. M : marqueur de poids moléculaire.

Alors que des produits d'amplification ont été générés pour les matrices environnementales conservées sous pression et incubées à 150 bars pendant 2 et 4 mois, aucune amplification positive n'a été obtenue pour celles incubées dans les mêmes conditions mais conservées à pression atmosphérique. Ce résultat a permis de suggérer une meilleure préservation sous haute pression de la communauté procaryotique ou de l'ADN environnemental séquestré dans les formations géologiques profondes. Néanmoins pour l'échantillon K2-17, comme aucune extraction d'ADN n'a été menée sur les

milieux incubés à pression atmosphérique, aucune comparaison entre les rendements d'amplification générés à partir des extraits ADN des cultures incubées sous pression et à pression atmosphérique n'a été possible. C'est en se basant sur la tendance des trois autres échantillons, et en particulier des matrices K2-20 et K2-19 les plus représentées dans ce travail, qu'une généralisation de ces observations a été suggérée.

Les amplifications les plus intenses ont été obtenues à partir des ADN extraits des roches conservées et incubées sous pression pendant 2 mois, pour les roches K2-20, K2-19 et K2-18, et pendant 4 mois, pour K2-17. Une période d'incubation de 4 mois sous pression a été souvent nécessaire pour obtenir des produits d'amplification à partir des matrices environnementales K2-18 et K2-17. Cette observation peut s'expliquer soit par une phase de revivification ou un développement plus lent des communautés procaryotiques séquestrées dans les aquitards sédimentaires profonds (K2-18 et K2-17) par rapport aux populations bactériennes détectées dans les aquifères (K2-20 et K2-19), soit par un temps de désorption plus long des molécules d'ADN rémanentes, biosignatures d'une communauté microbienne « fossile » (Inagaki et al., 2005), à partir des particules argileuses et calciques composants majoritaires des échantillons K2-18 et K2-17, qu'à partir des minéraux quartziques des roches K2-20 et K2-19. *A contrario*, une diminution de l'intensité des amplifications a été observée pour les roches K2-20 et K2-19 après 4 mois d'incubation. Cette chute d'intensité pourrait être expliquée par une lyse de la communauté procaryotique revivifiée et une dégradation accrue des molécules d'ADN libres induite par une période d'incubation trop longue à température élevée (55°C) et/ou la double dépressurisation des milieux de culture au quatrième mois d'incubation.

2. Comparaison des profils de diversité

19, 17, 7 et 3 profils de diversité ont été obtenus par DGGE respectivement pour les échantillons K2-20, K2-19, K2-18 et K2-17 à partir des produits d'amplification positifs uniquement (figure 44). Tous les échantillons de roches conservés et incubés sous pression pendant 2 mois ont présenté les profils de diversité les plus simples, composés de 3 à 7 bandes en fonction de l'échantillon étudié et présentant 2 bandes dominantes identiques pour tous les profils. Une complexification des profils de diversité a été constatée pour des temps d'incubation plus longs et ce, quel que soit la pression d'incubation appliquée. De plus, une récurrence de 3 bandes DGGE dominantes a été observée sur l'ensemble de ces profils. Les profils de diversité les plus complexes ont été obtenus pour les roches incubés pendant 4 mois sous pression, pour lesquels 11 (échantillon F2-K2-17) à 25 (échantillon B-K2-20) bandes DGGE ont été dénombrées. L'obtention de profils DGGE plus ou moins

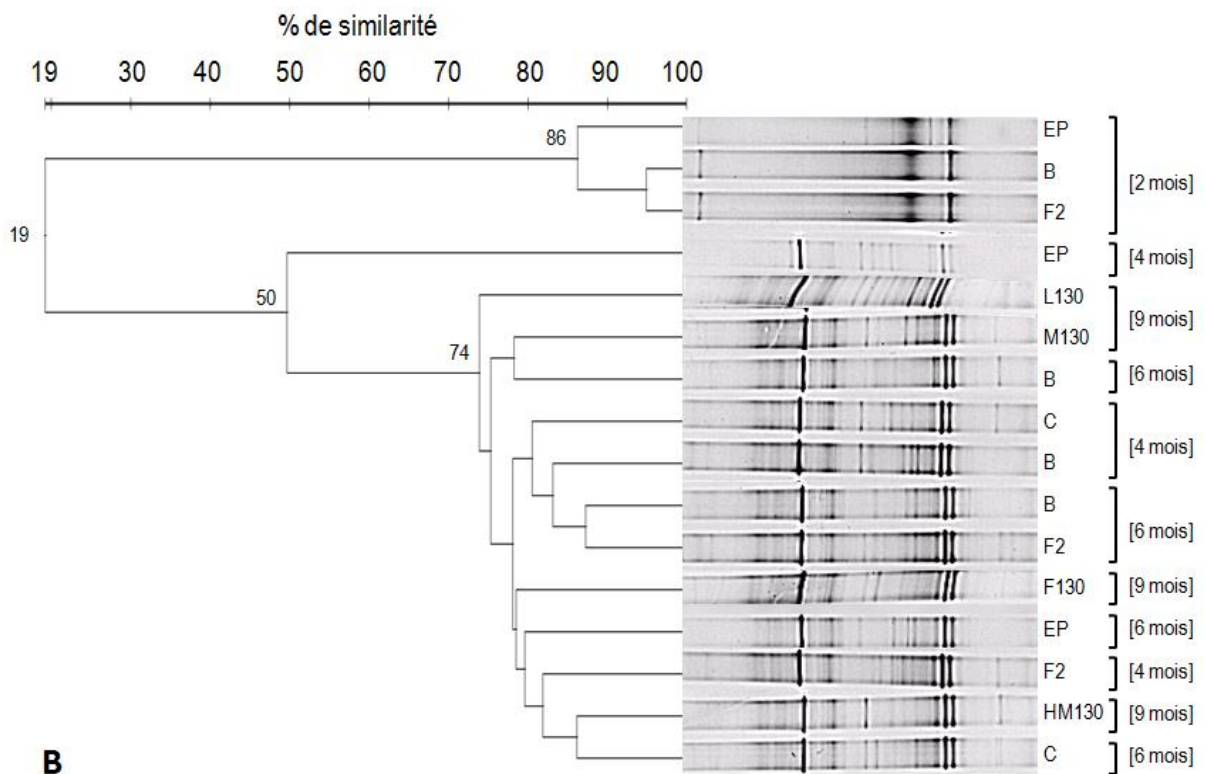
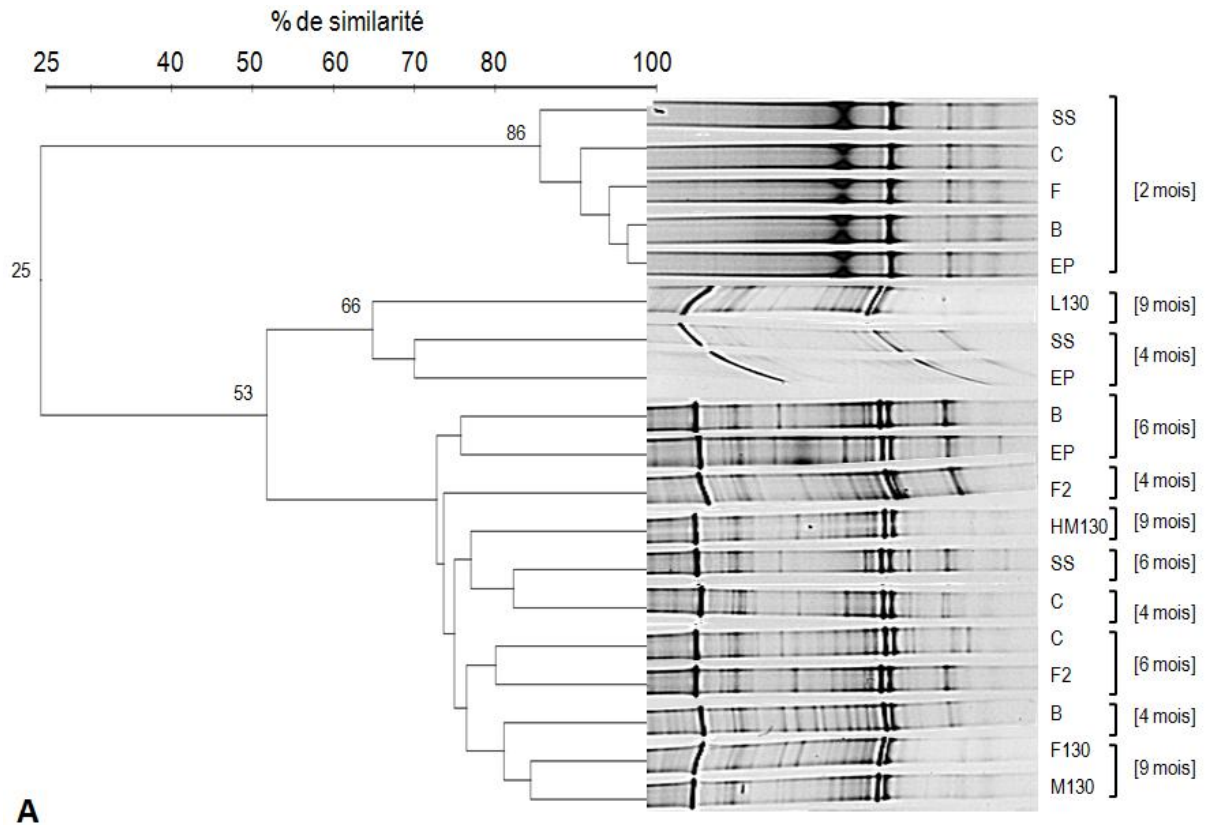
complexes composés de bandes d'intensité variable et migrant à différentes positions (Figure 45) a suggéré une variation, au cours du temps, des structures des communautés bactériennes endogènes des matrices environnementales.

Pour chaque échantillon de roche sédimentaire profonde, les similarités entre les profils DGGE, obtenues par une analyse statistique UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) prenant en compte l'ensemble des bandes détectées sur chacun des gels, sont présentées sur les dendrogrammes A, B et C (figure 45). Sur les 3 dendrogrammes, les échantillons ont été regroupés en fonction des temps d'incubation. En effet, les plus fortes divergences ont été obtenues entre les groupes formés des échantillons incubés sous pression pendant 2 mois, et ceux incubés sur une période plus longue (respectivement 25, 19 et 15 % de similarité pour les échantillons K2-20, K2-19 et K2-18). En effet, la plupart des bandes visibles sur les profils de diversité des incubations d'une durée minimale de 4 mois n'ont pas été détectables sur ceux correspondant aux échantillons incubés pendant 2 mois. En outre, la présence des échantillons K2-19 et K2-18 dans le même groupe (dendrogramme C) a suggéré que les profils de diversité obtenus après 2 mois d'incubation sous pression étaient fortement similaires entre les différentes roches.

Parmi les échantillons incubés plus de 2 mois, un groupe divergeant (aux alentours de 50 % de similarité), a été constaté sur les dendrogrammes A et B de la figure 45. Toutefois, la divergence des empreintes moléculaires des communautés bactériennes de ce groupe est probablement liée à la position des pistes sur les gels DGGE initiaux (situés au niveau des deux derniers puits des extrémités droite et gauche des gels) et non aux matrices environnementales incubées. L'effet de bord, artefact bien connu de la technique de DGGE qui se caractérise par une inclinaison progressive des bandes DGGE positionnées sur les pistes aux extrémités du gel, est bien visible et a donc pu induire une mauvaise affiliation des bandes DGGE lors de l'analyse des gels. De plus, une coloration hétérogène des bords du gel DGGE a pu se produire ce qui expliquerait les intensités plus faibles des bandes DGGE mais également la non-détection des bandes minoritaires.

Les profils de diversité des échantillons incubés sous pression pendant 4 mois et à pression atmosphérique pendant 6 et 9 mois ont présenté des pourcentages de similitude élevés, compris entre 70 et 90 % pour les échantillons K2-20 et K2-19 (dendrogrammes A et B) et entre 60 et 90 % pour les échantillons K2-18 (dendrogramme C). De plus, le regroupement des profils de diversité préférentiellement en fonction des temps d'incubation (dendrogrammes B et C) a montré que la nature des milieux d'enrichissement influençait peu la structure des communautés procaryotiques dans le cadre de cette étude. Concernant l'échantillon K2-17, seuls les profils de diversité correspondant aux échantillons incubés sous pression pendant 4 mois ont été obtenus. Néanmoins, les profils des

échantillons K2-17 ont été statistiquement différenciés de ceux des échantillons K2-18 (dendrogramme C) indiquant la présence de communautés bactériennes spécifiques dans chacune de ces roches.



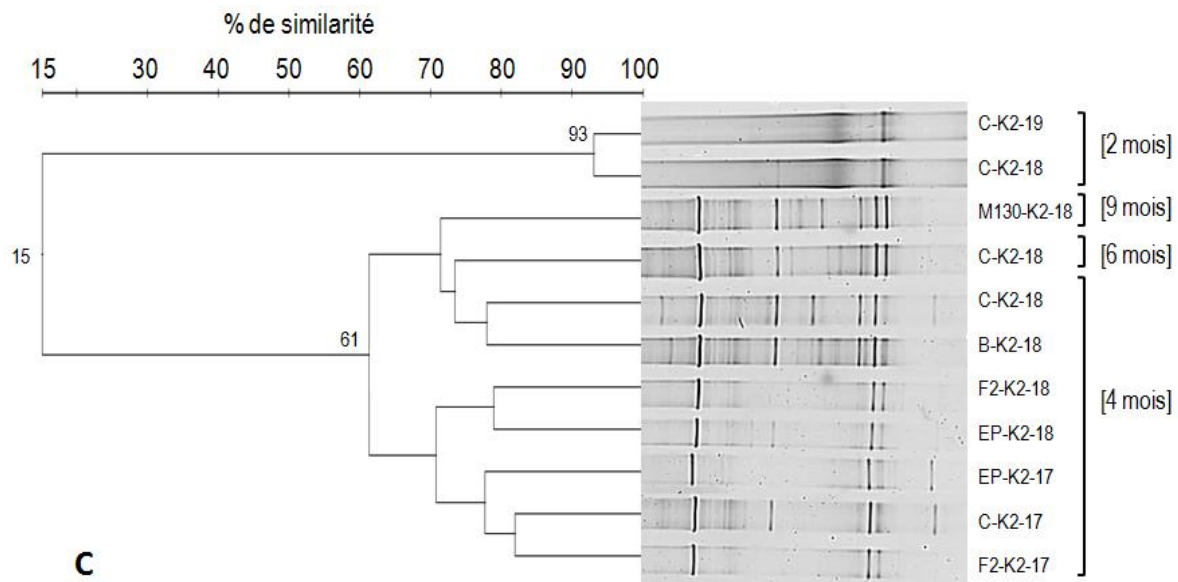


Figure 45. Dendrogrammes de similarité et profils DGGE des fragments de gène codant l'ARNr 16S amplifiés à partir des matrices environnementales incubées. A : Echantillons de roches K2-20 incubées, B : Echantillons de roches K2-19 incubées et C : Echantillons de roches K2-18 et K2-17 incubées. Chaque profil de diversité a été généré à l'aide de 300 à 400 ng d'ADN. Les temps d'incubation sont également indiqués entre crochets.

3. Diversité bactérienne

Afin de mieux appréhender l'évolution de la structure de la communauté bactérienne endogène au cours du temps, la biodiversité contenue dans les échantillons à l'état zéro, *i.e.* sous forme de matrices non incubées, a été comparée à celles présentes dans les roches incubées pendant 2, 4, 6 et 9 mois. Cette étude s'est focalisée uniquement sur les échantillons de roche K2-20. Ce choix a été justifié d'une part par les caractéristiques intrinsèques de la formation sédimentaire (porosité, salinité, teneur en eau...), favorables à la présence d'une communauté microbienne autochtone, et d'autre part, à la quantité et/ou qualité des ADN environnementaux extraits des échantillons de roches K2-20 à l'état initial (cf. chapitre III partie 2 paragraphe 3.1.) et incubés, permettant de générer par PCR directes des quantités de produits d'amplification (d'environ 1500 pb) adaptées à la réalisation d'une analyse moléculaire plus approfondie.

Les analyses ont porté sur une sélection de six échantillons principaux correspondant à (i) quatre incubations à 2, 4, 6 et 9 mois et (ii) aux deux matrices environnementales non incubées ayant servi d'inocula, celle conservée à pression atmosphérique (K2-20-At) et celle conservée sous pression à 190 bars (K2-20-P10X). La sélection des incubations a été basée sur la complexité des profils DGGE

présentés dans le dendrogramme A (figure 45). Le profil de diversité le plus complexe obtenu à partir de la roche K2-20, *i.e.* incubée en condition de sulfato-réduction pendant 4 mois ou le profil B-4mois, a été choisi. Dans un souci d'homogénéité, les 3 autres incubations sélectionnées (B-2mois, B-6mois et L130-9mois) ont été réalisées sur des milieux d'enrichissement ciblant également les BSR.

Deux autres échantillons, K2-20-P1X et EPbis-2mois, ont aussi été analysées par DGGE. Comme l'échantillon K2-20-P10X, l'échantillon K2-20-P1X est composé de matrice sèche conservée sous pression. La seule différence entre ces deux échantillons se situe au niveau de la quantité de matrice utilisée pour l'extraction d'ADN (0,5 g de roche pour l'échantillon K2-20-P1X et 5 g pour K2-20-P10X). La même matrice incubée a été utilisée pour extraire l'ADN des échantillons EPbis-2mois et EP-2mois. Ici, la différence a résidé dans la conservation de la matrice environnementale incubée. Pour l'échantillon EP-2mois, l'extraction d'ADN a été réalisée immédiatement après l'arrêt de l'incubation alors que pour l'échantillon EPbis-2mois, la matrice environnementale a été congelée avant l'étape d'extraction d'ADN.

Des profils DGGE identiques, en termes d'intensité relative et de position de migration des bandes, ont été obtenus pour les échantillons K2-20-P1X et K2-20-P10X montrant la reproductibilité de la technique de DGGE mais également celle de la méthode d'extraction. De plus, l'obtention de profils de diversité semblables a indiqué qu'une quantité de 0,5 g de roche renfermait une communauté bactérienne aussi représentative qu'une quantité 10 fois plus importante. En 2003, l'étude menée par Ranjard et al. sur les stratégies d'échantillonnage de sols en écologie moléculaire avait également conclu que la taille de l'échantillon n'influçait pas l'accès à la structure de la communauté bactérienne.

Les profils de diversité des échantillons B-2mois, B-4mois et B-6mois (figure 46) ont montré des structures de communautés bactériennes majoritaires identiques à celles visibles sur des profils DGGE de la figure 45 (dendrogramme A). La plus faible intensité des profils de la figure 46 a été induite par la quantité d'ADN moindre déposée par puits (300 ng au lieu de 400 ng). En revanche, le profil DGGE de l'échantillon EPbis-2mois était significativement distinct de celui de l'échantillon EP-2mois. Bien que les deux ADN aient été extraits de la même matrice environnementale incubée, les extraits n'ont pas été considérés comme identiques du fait des différences de conservation de la matrice environnementale. En effet, la congélation de la matrice a pu endommager les cellules bactériennes et les molécules d'ADN présentes et ainsi modifier la structure de la communauté bactérienne détectée. Ce résultat a montré que le mode de conservation des échantillons impactait directement sur la structure des communautés microbiennes.

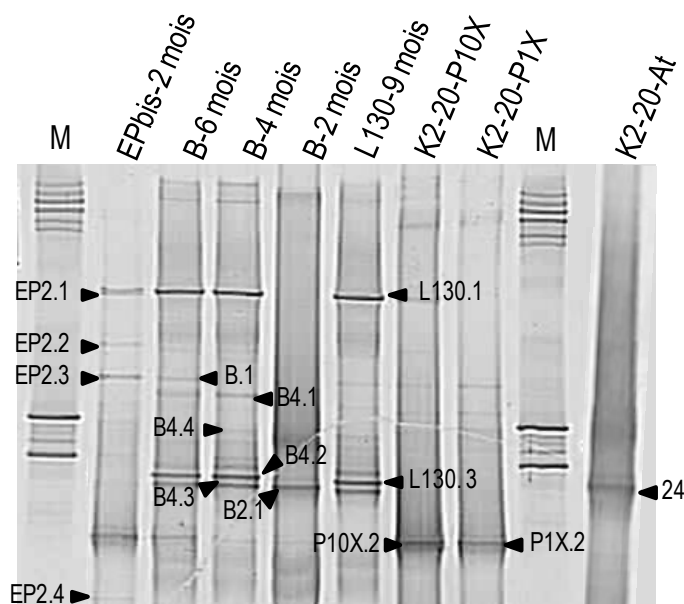


Figure 46. Structure des communautés bactériennes majoritaires détectées par DGGE à partir de différentes matrices environnementales K2-20. La piste K2-20-At a été artificiellement ajoutée au gel DGGE et provient de la figure 38 (cf. chapitre III partie 2). Les flèches indiquent les bandes séquencées. M : Standard de mobilité.

Les bandes DGGE majoritaires détectées sur les profils de diversité de ces 6 échantillons ont été identifiées (figure 46, tableau 25). Les bandes DGGE identifiées à partir de l'échantillon EPbis-2mois ont été utilisées uniquement pour avoir une vision plus large de la diversité bactérienne présente dans la formation sédimentaire K2-20.

Parmi les 11 bandes DGGE identifiées (figure 46), 8 séquences se sont avérées similaires à celles retrouvées dans les banques de clones et une, apparentée à l'espèce *Delftia acidovorans*, a été assimilée à de la contamination (cf. banque de contaminant, chapitre III partie 2). L'une des deux séquences restantes (B4.4) a été affiliée à *Pelomonas saccharophila* (Xie et Yokota, 2005), *Betaproteobacteria* capable de croître de manière autotrophe sur H_2 . Le genre *Pelomonas* a été fréquemment rencontré dans les environnements froids tels que les glaciers (Tong et al., 2008; An et al., 2010) ou les sédiments marins profonds (Inagaki et al., 2002) et dans les biotopes oligotrophes (Gomila et al., 2007; Taniguchi et Hamasaki, 2008; GenBank HQ910261). La séquence de la bande B4.4 a également été apparentée à un clone environnemental détecté dans un sol contaminé au pétrole (GenBank JN038274). En outre, certaines espèces de *Pelomonas* se sont avérées aptes à dégrader les composés aromatiques (Stringfellow et Aitken, 1995). La dernière séquence (B4.1) n'a pu être apparentée, avec robustesse, qu'au niveau du phylum via l'outil *Classifier* disponible sur le site RDP10.

Cette séquence, appartenant au phylum des *Proteobacteria*, ne présentait que 93 % de similarité de séquence avec son plus proche voisin, un clone environnemental appartenant à la communauté bactérienne d'un sol de prairie (Elshahed et al., 2008) et 86 % identité avec *Desulfobacca acetoxidans*, BSR dégradant l'acétate appartenant au *Deltaproteobacteria* (Oude Elferink et al., 1999).

L'identification de quatre bandes DGGE additionnelles à partir du profil EPbis-2mois a mis en évidence l'existence d'une fraction bactérienne appartenant aux *Firmicutes* dans les échantillons de roches incubées. En effet, la bande EP2.4 a été affiliée à la famille des *Thermoactinomycetaceae*, composée majoritairement de bactéries aérobies thermophiles, et a présenté 95 % de similarité de séquence avec *Planifilum fimeticola*, bactérie thermophile isolée lors d'un processus de compostage haute température (Hatayama et al., 2005). De plus, cette séquence a été étroitement apparentée à des clones environnementaux également détectés dans du matériel composté (GenBank HM036052; GenBank AM930295; Yamada et al., 2008). Bien qu'appartenant au domaine *Bacteria*, la bande DGGE EP2.2 n'a pu être étroitement apparentée à aucun microorganisme connu à ce jour. Toutefois, la séquence de cette dernière bande a été fortement affiliée à un clone environnemental, détecté dans l'eau de surface de l'océan Pacifique, considéré comme appartenant aux *Alphaproteobacteria* (Taniguchi et Hamasaki, 2008).

L'étude de la diversité contenue dans les échantillons de roches K2-20 à l'état zéro et incubés a fourni une image inattendue de la composition des membres du domaine *Bacteria* présents dans cet écosystème. En effet, les potentielles caractéristiques physiologiques et phénotypiques de la majorité d'entre eux ne sont pas adaptées aux propriétés principales de la matrice environnementale initiale avec notamment l'anaérobiose, les températures élevées et les fortes salinités. Les rôles *in-situ* de ces microorganismes ainsi que leur origine restent à découvrir. Toutefois, certains des clones énumérés ci-dessus ont été rencontrés dans des écosystèmes présentant une ou plusieurs caractéristiques communes avec l'environnement étudié telles que la profondeur, la température, la limitation en nutriments et la texture (roche). De plus, la prépondérance des séquences affiliées aux *Proteobacteria* retrouvées dans nos échantillons est en accord avec d'autres études environnementales d'écosystèmes profonds (Chandler et al, 1997 ; Balkwill et al., 1989 ; Marchesi et al., 2001 ; Zhang et al., 2005).

Tableau 25. Identification des bandes DGGE excisées

Groupe phylogénétique	Bandes DGGE	Espèces décrites apparentées (N°accession GenBank et identité de séquence)	Clones environnementaux (N°accession GenBank et identité de séquence)	Environnements
<i>Fimicutes</i>	EP2.4	<i>Planifilum fimeticola</i> (AB088364 ; 95 %)	Clone 23s-33 (HM036052; 99 %)	Composts
<i>Alphaproteobacteria</i>	B2.1, 24	<i>Mesorhizobium</i> sp. (FR749843; 99 %)	Clone BL_67 (HQ910700 ; 99 %)	Matériaux nucléaires corrodés, environnements froids, aquifère, coraux
<i>Betaproteobacteria</i>	EP2.3, B.1	<i>Delftia acidovorans</i> (JF700415; 99%)	Clone AB_75 (HQ911302; 99 %)	Dans cette étude, assimilée à de la contamination
	B4.4	<i>Pelomonas saccharophila</i> (AM501432 ; 98 %)	Clone EK_An371 (JN038274 ; 98 %)	Environnement contaminé, milieu désertique, eau de mer
	L130.1, EP2.1	<i>Ralstonia</i> sp. (AY216797 ; 99 %)	Clone DWIC04 (HQ711911 ; 99 %)	Eau potable, paroi de caverne, lacs et drainages miniers acides
<i>Gammaproteobacteria</i>	P1X.2, P10X.2	<i>Halomonas meridiana</i> (HM068949 ; 99 %)	Clone ncd1610f11c1 (JF138980 ; 99 %)	Homme, eau de mer, pétrole, sédiments marins profonds, roches,
<i>Proteobacteria</i>	B4.1	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> (CP002629 ; 86 %)	Clone FFCH8003 (EU134517 ; 93 %)	Sols, nappe phréatique, paroi de caverne karstique
<i>Bacteria</i>	EP2.2	<i>Desulfofrigus oceanense</i> (AB568590 ; 92 %)	Clone KH03-30B (AB307981 ; 99 %)	Eau de mer, environnement aride, sols
	B4.3, B4.2, L130.3	<i>Gloeobacter violaceus</i> (FR798924 ; 84 - 86 %)	Clone S15D-MN45 (AJ583205 ; 99 %)	Aquifère d'un site de dépôt de déchets radioactifs, sédiment de rivière contaminés

En parallèle, une étude de la diversité des membres du domaine *Bacteria* de la formation sédimentaire profonde K2-20 a été réalisée à partir de bibliothèques de gènes codant l'ARNr 16S construites pour les échantillons K2-20-At, K2-20-P10X, B-2mois, B-4mois, B-6mois et L130-9mois. Pour 24 clones criblés aléatoirement pour chacune de ces six bibliothèques, le pourcentage de couverture était respectivement de 95,5 %, 95,8 %, 100 %, 85,7 %, 95,5 % et 95,8%. La totalité des clones criblés s'est répartie sur seulement 8 OTU mettant en évidence la faible biodiversité contenue dans les échantillons de la roche K2-20 incubée ou non (figure 47). Une diversité aussi pauvre pourrait être expliquée par les conditions stressantes et/ou spécifiques régnant dans les environnements terrestres profonds. Des observations similaires ont été faites pour des populations microbiennes colonisant d'autres écosystèmes terrestres profonds (Chandler et al., 1997) ou encore les sédiments marins séquestrant des hydrates de méthane (Marchesi et al., 2001).

Une biodiversité inattendue a été retrouvée à partir de la roche K2-20 incubée ou non, mettant en évidence des communautés bactériennes semblant, *a priori*, inadaptées aux conditions de culture appliquées au cours des expérimentations (milieux d'enrichissement et conditions de température, salinité et pression). En effet, des taxons mésophiles et psychrophiles ont été trouvés alors que les incubations ont été menées à une température plus élevée (55°C) et les fragments de séquences codant l'ARNr 16S ont été affiliés à des OTU représentés par des bactéries aérobies, microaérophiles ou anaérobies facultatives bien que des procaryotes anaérobies aient été initialement recherchés. De plus, la plupart des taxons identifiés se sont également avérés incapables de se développer en présence de forte teneur en sel à l'exception du genre *Halomonas* et plus précisément des espèces *H. venusta* et *H. meridiana* pouvant survivre respectivement en présence de 200 et 250 g.L⁻¹ de NaCl (Kaye et al., 2004). Toutefois, les séquences ont également été affiliées à des clones environnementaux ou des isolats bactériens retrouvés dans des écosystèmes profonds et ce, malgré l'ensemble des caractères cités précédemment. Comme cité dans la seconde partie du chapitre III, si aucune indication n'est mentionnée dans le texte, les valeurs de similarité de séquence étaient supérieures ou égales à 98 % par Blast, *i.e.* supérieure à celle définissant la limite de l'espèce fixée à 97 % (Wayne et al., 1991).

Sur les 8 OTU identifiés, 7 (*i.e.* 92,0 % des clones ; N=137) ont été apparentés au phylum des *Proteobacteria* et le taxon restant (*i.e.* 8,0 % des clones ; N=137) n'a pu être affilié à aucune espèce bactérienne connue à ce jour. Ce dernier pourrait constituer une nouvelle espèce voire un nouveau genre car la bactérie la plus proche, la cyanobactérie *Gloeobacter violaceus*, ne présentait que 85 % de similarité avec la séquence associée au taxon. Néanmoins, cette séquence a également été apparentée

à un clone environnemental retrouvé dans l'eau souterraine d'un puits d'injection profonde sur un site de stockage de déchets radioactifs (GenBank AJ583205).

Parmi les séquences associées aux *Proteobacteria*, 34,9 % étaient étroitement apparentées au genre *Ralstonia*. Ce genre a été retrouvé dans de nombreuses niches écologiques et s'est avéré posséder de nombreuses capacités et spécificités telles que la fixation de l'azote (Chen et al., 2001), l'hydrogénotrophie ou encore la colonisation de biotopes riche en métaux (Mergeay et al., 2003). Certaines espèces, et notamment *R. metallidurans*, possèdent des gènes de résistance aux métaux qui leur permettent d'être adaptés aux environnements difficiles. D'ailleurs, la séquence affiliée à cet OTU s'est révélée fortement apparentée à celles de clones environnementaux retrouvés dans l'eau souterraine d'un puits d'injection profonde sur un site de stockage de déchets radioactifs (GenBank AJ583178), dans les déchets miniers uranifères (GenBank FM877658), dans les sédiments charbonneux d'un lac artificiel (Blothe et al., 2008) et dans les sédiments marins profonds renfermant des hydrates de méthane (Marchesi et al., 2001). Certaines souches de *Ralstonia* se sont également montrées capables d'entrer dans un état de dormance qui pourrait expliquer leur survie et leur persistance sur le long terme (Grey et Steck, 2001). En outre, ce groupe taxonomique a été uniquement retrouvé dans les matrices environnementales B-4mois, B-6mois et L130-9mois incubées sur de longues périodes (≥ 4 mois) où il forme le principal taxon.

Le second OTU le plus important (27 % des *Proteobacteria*) a été affilié au genre *Halomonas* et en particulier à deux espèces, *H. meridiana*, décrite comme extrêmement halotolérante par James et al. en 1990, et *H. venusta*. Deux membres appartenant à l'espèce *H. meridiana*, initialement isolée d'un lac salé en Antarctique ont été détectés dans l'environnement d'un événement hydrothermal océanique profond (Kaye et al., 2004) suggérant des capacités de survie en conditions extrêmes. Cet OTU a aussi été affilié à des clones environnementaux retrouvés dans des sédiments marins profonds riches en méthane (Kobayashi et al., 2008), dans des dépôts salés anciens (GenBank EF177668), et dans divers écosystèmes marins (Su et al., 2011 ; GenBank DQ396349 ; GenBank FJ497697). L'association stricte de ce taxon aux échantillons conservés sous haute pression pourrait signifier la nécessité d'appliquer une pression élevée afin de préserver ce groupe taxonomique dans les environnements profonds. Par conséquent, ce taxon serait fortement sensible aux diminutions de pression et donc adapté aux écosystèmes de subsurface. Toutefois, ce taxon a également été affilié à une séquence issue de boues d'un forage offshore (GenBank AB369212) suggérant une potentielle origine allochtone, via une contamination par les boues de forage, comme une origine endogène des milieux de subsurface.

L'OTU affilié au genre *Achromobacter*, correspondant à 18,2 % des *Proteobacteria*, a également été détecté dans les environnements contaminés aux métaux lourds (GenBank HQ132430) et aux HAP (La Rosa et al., 2006), dans les écosystèmes miniers aurifères (GenBank AY027504) ainsi que dans des biotopes profonds (Balkwill et al., 1989; Johnson et al., 1968). Dans notre étude, ce groupe taxonomique a été principalement détecté dans l'échantillon de roche incubé sous pression pendant 2 mois.

Le taxon suivant le plus répandu (16,7 % des *Proteobacteria*) a été apparenté au genre *Mesorhizobium*, groupe taxonomique décrit dans la partie précédente (chapitre III partie 2) et majoritairement retrouvé dans la matrice environnementale K2-20 non incubée et conservée à pression atmosphérique.

Enfin, parmi les OTU les moins représentés (0,8 à 1,6 % des séquences *Proteobacteria*), un OTU a été apparenté au genre *Burkholderia* détecté dans les environnements contaminés et d'où une espèce a été identifiée comme dégradant les trichloréthylènes (Zhang et al., 2000). Une séquence a été affiliée à la bactérie microaérophile à croissance lente *Bradyrhizobium*, genre aussi détecté dans des sédiments marins profonds (Marchesi et al., 2001). Le groupe taxonomique apparenté au genre *Acidocella* a également été retrouvé dans les échantillons de roches incubées pendant 9 mois. Cette bactérie acidophile a été fréquemment détectée dans les drainages miniers acides et les environnements toxiques chargés en métaux (Mirete et al., 2007; Yeung et al., 2011). Ce microorganisme a aussi été retrouvé dans des dépôts volcaniques (Weber et King, 2010) et dans des grès datant du Crétacé chargés en produits pétroliers naturellement dégradés (Röling et al., 2006).

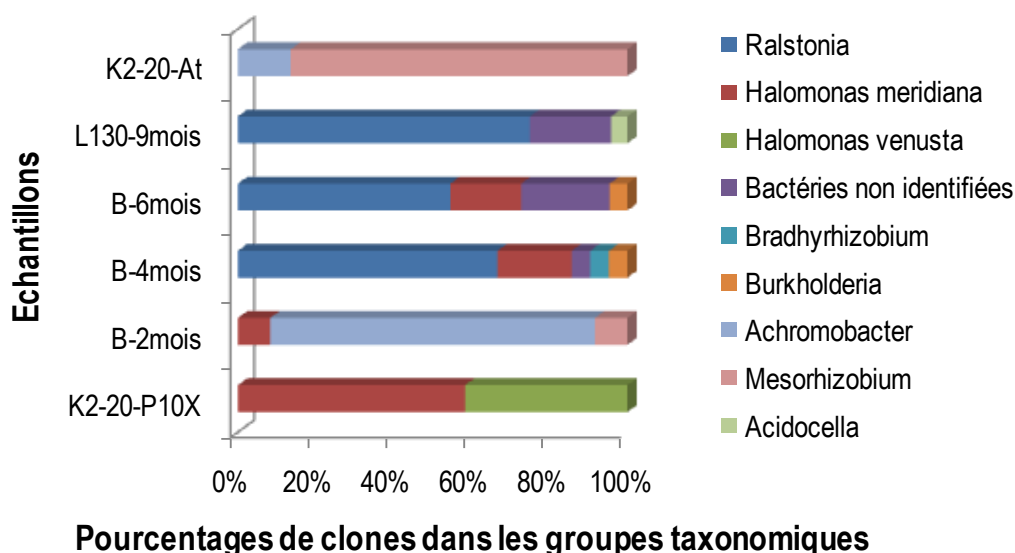


Figure 47. Proportion et répartition des groupes taxonomiques appartenant au domaine *Bacteria* retrouvés dans les différents échantillons K2-20. Chaque barre montre la distribution relative des groupes taxonomiques reportée dans chaque banque de gènes codant l'ARNr 16S.

4. Conclusion

Les faibles quantités d'ADN extraits des différents échantillons de roches brutes ou incubées ont permis de suggérer que l'ADN était très probablement originaire soit d'une faible biomasse peu productive, soit d'une communauté bactérienne totalement inactive dans un état viable mais incultivable dans les milieux d'enrichissements actuels, soit de molécules d'ADN adsorbées sur les matrices environnementales ou contenues dans des cellules procaryotiques fossiles, traces de l'existence d'une ancienne communauté microbienne.

Les différences d'intensités d'amplification constatées en fonction des conditions d'incubation et des modes de stockage des roches brutes ont permis de suggérer une préservation accrue du matériel biologique séquestré dans ces échantillons originaires de formations profondes lorsqu'ils sont conservés et incubés sous haute pression. Toutefois, une seconde explication a été envisagée. Les produits d'amplification obtenus à partir des échantillons conservés et incubés sous pression pourraient être la conséquence d'une contamination des carottes de roche provoquée lors de la pressurisation des échantillons « entiers », *i.e* dont la périphérie n'avait pas été éliminée, par l'intrusion de résidus de fluides de forage contenus dans le centimètre périphérique vers le cœur de l'échantillon. Néanmoins, cette possibilité nous a semblé peu probable. En effet, pour les échantillons K2-18 et K2-17, le diamètre poral très faible (< 100 nm) rend peu probable la circulation de cellules procaryotiques. De plus, une

contamination microbienne par les fluides de forage aurait induit une augmentation des quantités d'ADN environnementaux extraits qui se traduirait par des rendements d'amplification plus importants à partir des roches non incubées conservées sous pression qu'à partir de celles conservées à pression atmosphérique, situation qui n'a pas été rencontrée au cours de l'étude. Néanmoins, la présence de contamination exogène en relation avec le processus de forage n'a pu être totalement exclue.

Des différences notables de structure des communautés bactériennes associées aux modes de conservation des échantillons et aux temps d'incubation des matrices environnementales ont aussi été mises en évidence pour les échantillons de roches profondes. Bien que d'autres facteurs aient probablement contribué à la sélection du matériel génétique détecté, une corrélation a pu être observée entre les structures des communautés bactériennes et les conditions d'incubation.

Les pourcentages de couverture élevés obtenus pour les différentes banques de clones ont montré la présence d'une communauté bactérienne faiblement diversifiée dans les compartiments géologiques profonds étudiés. De plus, une diversité surprenante composée en majorité de séquences affiliées à des organismes cultivés a été mise en évidence. Bien qu'apparentées à des taxons, pour la plupart mésophiles, aérobies et ne tolérant que les faibles voire très faibles salinités, ces groupes taxonomiques ont également été rencontrés dans divers environnements profonds et extrêmes en accord avec une origine autochtone des séquences détectées. En outre, la découverte d'un OTU (8 % des clones) associé à des bactéries non cultivées a permis de suggérer l'existence de microorganismes aux potentialités insoupçonnées dans les environnements terrestres profonds.

D'un point de vue technique, cette étude a mis en évidence la nécessité de contrôler l'adéquation des techniques et la reproductibilité des méthodes utilisées face aux échantillons naturels traités et ce, à différentes étapes de l'analyse. Tout d'abord, le mode de stockage et de conservation des échantillons a semblé directement impliqué dans l'accès à la communauté microbienne et dans la modification de la structure de cette population. Ensuite, l'utilisation d'une procédure d'extraction d'ADN reproductible et rapide permettant le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons a été indispensable pour la comparaison *in-fine* de multiples profils de diversité. A cette étape, la taille de l'échantillon a dû être suffisante pour permettre une représentativité correcte de la communauté procaryotique initiale séquestrée dans le compartiment géologique profond étudié. Enfin, des techniques moléculaires reproductibles et adaptées à la nature des échantillons traités ont été utilisées. Ces précautions ont été essentielles dans l'acquisition des données afin de ne pas biaiser les résultats.

Chapitre V :

**Effets des paramètres pression,
température et salinité sur
l'activité métabolique de souches
anaérobies originaires
d'environnements de surface et
de subsurface**

L'existence d'une communauté procaryotique active dans les environnements de subsurface tels que les sédiments marins profonds, les écosystèmes pétroliers ou encore les aquifères terrestres est maintenant connue jusqu'à plusieurs milliers de mètres de profondeur. Toutefois, les limites de cette biosphère profonde restent encore largement méconnues. Les paramètres physiques de pression et de température sont souvent perçus comme fondamentaux dans la définition des limites de vie en subsurface au même titre que la salinité, la teneur en eau, la disponibilité en sources de carbone et d'énergie ou encore la porosité. La combinaison de ces paramètres semble également conditionner l'activité microbienne des profondeurs.

Comme les travaux menés sur les formations sédimentaires du Trias n'ont pas permis d'isoler de microorganisme viable et cultivable, il est apparu pertinent de s'intéresser aux domaines de viabilité et d'activité de souches originaires de divers écosystèmes profonds soumis aux variations de différents paramètres physicochimiques en lien avec un enfouissement géologique. Il est en effet possible que les formations sédimentaires profondes étudiées précédemment correspondent à des zones stériles. Lors d'une subsidence, les formations géologiques sont soumises à une augmentation de la pression, du fait de l'augmentation de la charge sédimentaire, et de la température car les formations se rapprochent du compartiment mantélique chaud. De plus, dans le cas des formations sédimentaires du Trias situées dans le Bassin de Paris, l'augmentation de la profondeur s'accompagne également d'une hausse de la salinité car les temps d'équilibration des phases minérales avec les fluides sont plus importants. La zone d'échantillonnage la plus profonde de notre étude possède par ailleurs une porosité connectée ainsi que de l'eau libre. De plus, aucune oligotrophie singulière en comparaison avec celle habituellement rencontrée en subsurface n'a été observée. En revanche, cette zone est soumise à des pressions, températures (60 à 66°C) et salinités relativement élevées (entre 120 et 180 g.L⁻¹). Par conséquent, les domaines d'activité de souches de subsurface ont été étudiés en fonction des modifications de ces trois paramètres.

Bien qu'isolés à pression atmosphérique, les microorganismes anaérobies halophiles et thermo-tolérants originaires d'environnements profonds ont fourni une opportunité d'examiner les effets combinés de ces trois paramètres physico-chimiques sur l'activité bactérienne. Très peu d'études font référence à des travaux portant sur l'influence de ces trois facteurs à partir de microorganismes anaérobies halophiles. Au-delà d'un simple criblage de souches, cette étude avait pour objectifs (i) d'évaluer la capacité innée de survie et de croissance sous pression de souches anaérobies et thermo-tolérantes isolées d'environnements profonds et (ii) d'estimer la capacité des types trophiques fréquemment retrouvés dans les écosystèmes de subsurface, *i.e.* les méthanogènes, les réducteurs de

composés soufrés en distinguant les BSR des thiosulfato-réducteurs et les fermentaires, à faire face aux pressions hydrostatiques élevées.

1. Activités métaboliques

Huit souches anaérobies, halophiles et thermo-tolérantes, voire thermophiles, ont été soumises à différentes conditions d'incubation (température, pression et salinité). Six souches sont originaires de milieux profonds (*Methanothermococcus thermolithotrophicus*, *Desulfotomaculum geothermicum*, *Desulfovibrio profundus*, *Petrotoga mexicana*, *Thermosipho japonicus* et *Thermovirga lienii*) et deux de biotopes de surface (*Methanohalobium evestigatum* et *Halothermothrix orenii*). Parmi ces six souches « profondes », trois (*D. profundus*, *M. thermolithotrophicus*, *T. japonicus*) ont été précédemment décrites comme piézophiles (Bale et al., 1997 ; Bernhardt et al., 1988 ; Takai et Horikoshi, 2000). Chaque type trophique est représenté par deux souches (cf. chapitre II tableau 14).

Chaque souche a adopté un comportement différent face aux effets combinés des paramètres de température, pression et salinité. De manière générale, une diminution d'activité a été observée lors d'une augmentation de pression et/ou de salinité (figures 48 à 53). Néanmoins, les métabolismes fermentaires et thiosulfato-réducteurs ont semblé mieux adaptés aux hautes pressions (figures 52 à 54). En effet, leurs activités métaboliques mesurées après l'application d'une pression modérée (90 bars) ou élevée (180 bars) appartenaient aux activités les plus élevées obtenues. Il est cependant important de noter que cette étude n'a ciblé qu'une fenêtre restreinte de températures et de pressions qui ne correspondait pas obligatoirement aux conditions optimales des huit souches utilisées. Par conséquent, seules les tendances des comportements métaboliques des différentes souches en réponse aux facteurs température, pression et salinité ont été dégagées dans un domaine d'étude contraint.

Alors que la température optimale de croissance de l'archée méthanogène *Methanothermococcus thermolithotrophicus* avait été préalablement observée à 65°C (Huber et al., 1982), les plus importantes productions de méthane ont été mesurées à 40 et 55°C (respectivement 100 et 89,5%, figure 48 A). Selon les conditions expérimentales appliquées pendant cette étude, la pression est apparue comme un facteur limitant (à 55°C) voire inhibant (à 40°C) l'activité métabolique de cette souche bien qu'un caractère piézophile ait été décrit à 500 bars pour une température de 65°C par Bernhardt et al. (1988). Toutefois, une augmentation de la productivité de la souche (supérieure à 3%) a été observée lors d'une hausse de la température d'incubation (70°C) pour une pression constante de 90 bars (figure 48 B). Ce regain d'activité de *M. thermolithotrophicus* a confirmé qu'à une

salinité donnée ($S = 50 \text{ g.L}^{-1}$ équivalent NaCl), la souche possède les capacités physiologiques innées pour se développer dans des conditions extrêmes associant hautes température et pression. De plus, il semblerait que les conditions de température et de pression n'influencent pas la salinité optimale de *M. thermolithotrophicus*. En effet, quels que soient les paramètres de culture, les productions de méthane les plus élevées ont été enregistrées dans les milieux de salinité équivalente à 50 g.L^{-1} de NaCl (figure 48 A). Néanmoins, une modification de l'activité dans les domaines de salinités adjacentes a été constatée en fonction de la température. Alors qu'une production de méthane de l'ordre de 10% a été mesurée pour 110 g.L^{-1} équivalent NaCl à 40°C et à pression atmosphérique, une activité sensiblement identique a été détectée à 55°C et à pression atmosphérique mais pour 13 g.L^{-1} équivalent NaCl. Dans les conditions inverses, c'est-à-dire à 40°C en présence de 13 g.L^{-1} équivalent NaCl et à 55°C pour une salinité de 50 g.L^{-1} équivalent NaCl, les activités étaient inférieures à 1%. Ces variations d'activité semblent indiquer, pour cette souche, un déplacement de la gamme de tolérance aux sels en fonction de la température. La température pourrait donc exercer un effet sur la tolérance aux sels de certaines souches. Ce phénomène avait également été rencontré chez la bactérie fermentaire *Anaerobranca californiensis* pour laquelle une forte diminution de la salinité maximale tolérée, passant de 60 à 25 g.L^{-1} de NaCl, avait été constatée lors de l'augmentation de la température d'incubation de 58 et 70°C (Gorlenko et al., 2004).

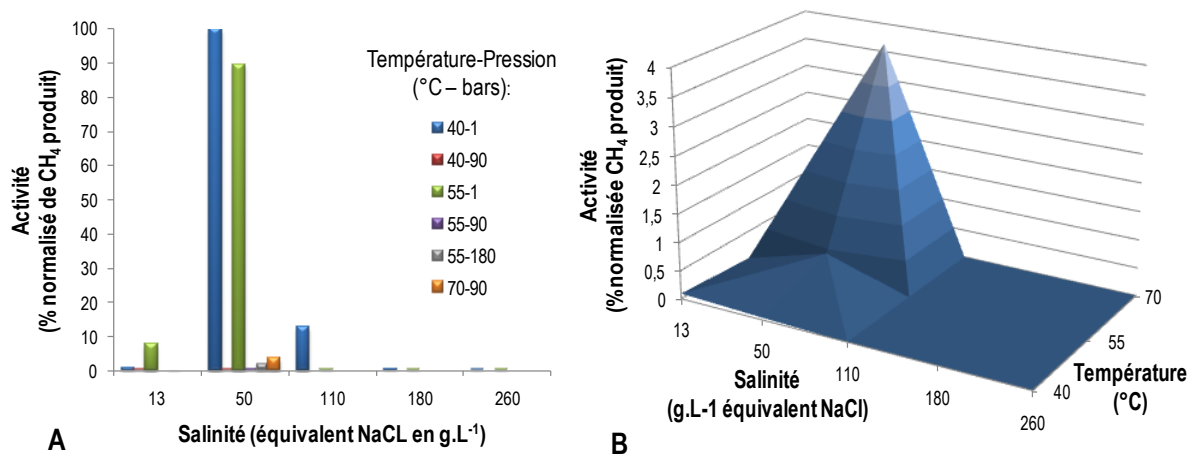


Figure 48. Activité métabolique normalisée de l'archée méthanogène *Methanothermococcus thermolithotrophicus* sous différentes conditions de température, pression et salinité (A) et à pression constante de 90 bars (B). Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L^{-1} de NaCl et incubé à 40°C à 1 bar.

En ce qui concerne la seconde méthanogène étudiée, *Methanohalobium evestigatum*, bien que cette archée soit sensée se développer à 55°C (Zhilina et Zavarzin, 1987), aucune activité n'a été

détectée à cette température dans le milieu d'étude utilisé. Les activités ont été retrouvées uniquement à une température de 40°C (figure 49). Toutefois, le caractère halophile extrême de la souche a été confirmé par les fortes concentrations de méthane produit en présence de 110, 180 et 260 g.L⁻¹ équivalent NaCl avec un maximum à 260, salinité proche de la salinité optimale décrite par Zhilina et Zavarzin (1987). En outre, une inactivité manifeste de la souche a été constatée lors de l'application d'une pression. De ce fait, *M. evestigatum* est apparu comme fortement piézo-sensible et strictement adaptée aux environnements hypersalés de surface, biotopes dont elle est initialement issue.

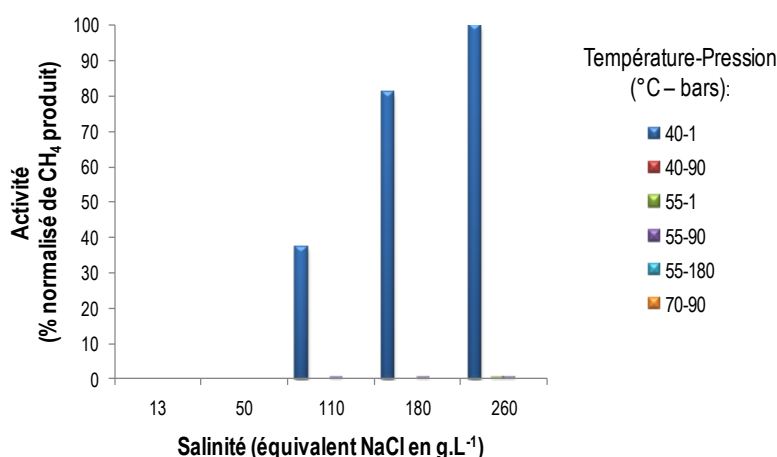


Figure 49. Activité métabolique normalisée de l'archée méthanogène méthylotrophe *Methanohalobium evestigatum* sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 260 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 40°C à 1 bar.

Un déplacement du maximum d'activité a été observé pour la BSR *Desulfotomaculum geothermicum* à pression atmosphérique. L'augmentation de la température s'est accompagnée d'une augmentation de l'activité en présence d'une concentration en sels plus élevée (50 g.L⁻¹ équivalent NaCl) à 1 bar (figure 50). Toutefois, le domaine d'activité de la souche en fonction de la salinité n'a pas été modifié comme cela a été précédemment observé pour *M. thermolithotrophicus* (figure 48). Bien que l'activité maximale ait été mesurée à pression atmosphérique, sous certaines conditions (40°C/90bars/13 et 50 g.L⁻¹ équivalent NaCl et 55°C/180bars/13 g.L⁻¹ équivalent NaCl), l'application d'une pression a permis de conserver des niveaux d'activité élevés (> 50%) prouvant la nature piézo-tolérante de cette bactérie. De plus, l'application d'une pression élevée (180 bars) associée à une température d'incubation proche de la température maximale (55°C) et d'une salinité relativement faible (13 g.L⁻¹ équivalent NaCl) a permis de conserver une activité métabolique similaire à celle obtenue à pression atmosphérique dans les mêmes conditions. En revanche, une température plus modérée

(40°C) a eu pour effet de maintenir le niveau d'activité pour une salinité plus élevée (50 g.L⁻¹ équivalent NaCl). Par conséquent, il semblerait que le couple température/pression impacte sur la tolérance aux sels de cette souche.

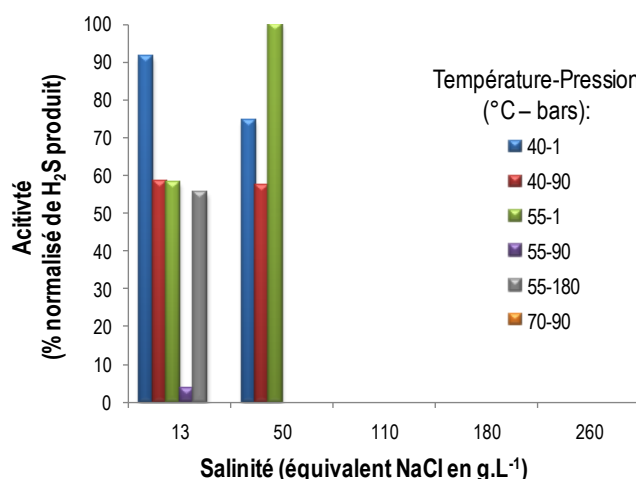


Figure 50. Activité métabolique normalisée de la bactérie sulfato-réductrice *Desulfotomaculum geothermicum* sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 55°C à 1 bar.

A l'inverse de la BSR précédente, les températures expérimentales d'incubation permettant l'activité métabolique de la BSR *Desulfovibrio profundus* divergeaient de celles décrites dans la littérature. En effet, une production d'hydrogène sulfuré a été uniquement détectée à 40°C sur le milieu utilisé (figure 51) alors que cette bactérie devrait être active jusqu'à 65°C. De plus, une activité minimale (de l'ordre de 0,5%) a été enregistrée à 110 g.L⁻¹ de sels alors que la salinité maximale acceptée par cette souche se situe en principe autour de 100 g.L⁻¹ (Bale et al., 1997). En 2004, Kaye et Baross avaient constaté que la composition des milieux de culture avait une influence sur les températures cardinales d'une souche d'*Halomonas*, il se pourrait que la composition des milieux de culture impacte également sur d'autres paramètres cardinaux comme ici la salinité. Cette bactérie s'est également avérée active sous une pression modérée de 90 bars, pression proche de la pression optimale (100 à 150 bars) (Bale et al., 1997) mais à un moindre niveau (15%) que sous pression atmosphérique. Elle s'est de plus révélée inactive à 180 bars. Il est cependant important de noter que la pression optimale de croissance de la bactérie piézophile *D. profundus* a été déterminée pour une température optimale de 25°C (Bale et al., 1997) ce qui pourrait expliquer ces différences notables d'activité entre 25 et 40°C pour une même pression.

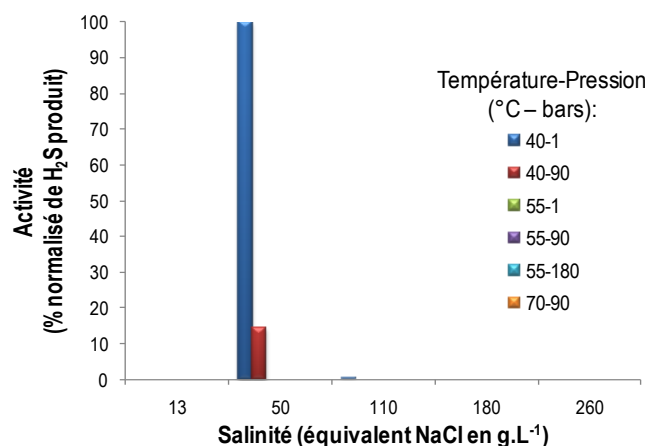


Figure 51. Activité métabolique normalisée de la bactérie sulfato-réductrice *Desulfovibrio profundus* sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 40°C à 1 bar.

L'activité maximale de *Petrotoga mexicana* a été mesurée à 40°C (figure 52 A) bien que la température optimale de croissance de cette bactérie thiosulfato-réductrice soit située à 55°C (Miranda-Tello et al., 2004). Une activité métabolique associée à une forte croissance cellulaire a également été enregistrée à 70°C sous 90 bars de pression (figures 52 A et 55 E) alors qu'à pression atmosphérique, les températures supérieures à 65°C interdisent toute croissance (Miranda-Tello et al., 2004). L'application d'une pression a donc permis d'augmenter la température maximale de croissance de *P. mexicana* et ainsi d'étendre sa gamme de température de cultivabilité. L'importante croissance et activité de la souche à 70°C laisse supposer qu'elle pourrait demeurer active à des températures supérieures dans ces conditions de pression. De plus, une augmentation de la production d'H₂S par cette bactérie sous pression a été constatée à 55°C (90 et 180 bars) en présence de 50 et 110 g.L⁻¹ équivalent NaCl et à 40°C (90 bars) avec une quantité moindre de sels (13 g.L⁻¹). Ces augmentations d'activité sous pression suggèrent d'une part un potentiel caractère piézophile de la souche et d'autre part, une influence du couple température/pression sur la tolérance aux sels. En outre, un effet « palier », résultat d'une activité bactérienne relativement importante (environ 60%) et constante à 55°C, a été observé sur une large fraction du domaine de salinité, i.e. pour une salinité comprise entre 13 et 110 g.L⁻¹ et une pression comprise entre 1 et 180 bars (figure 52 B). Ce phénomène semble indiquer qu'à température optimale, les variations de l'activité métabolique de *P. mexicana* seraient essentiellement liées à la salinité du milieu.

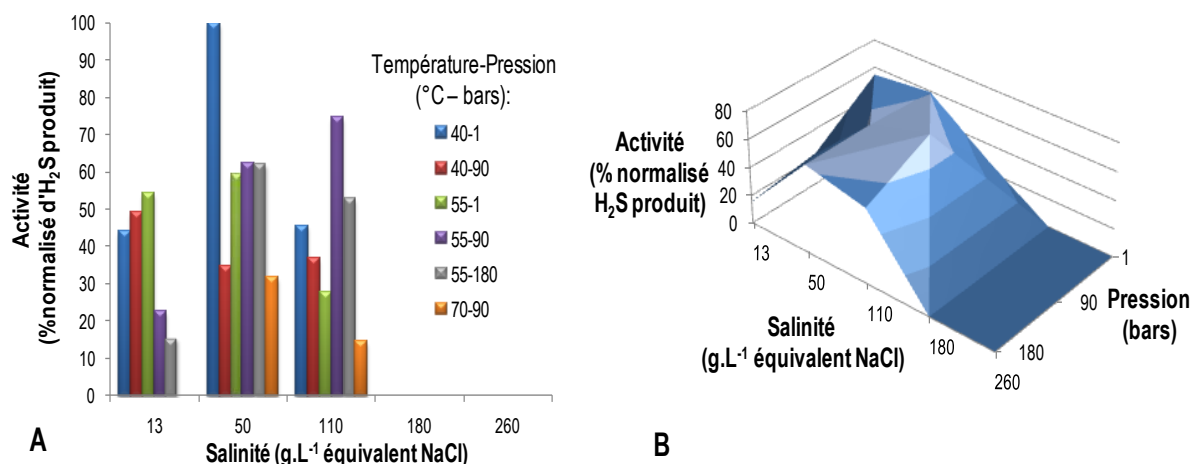


Figure 52. Activité métabolique normalisée de la bactérie thiosulfato-réductrice *Petrotoga mexicana* sous différentes conditions de température, pression et salinité (A) et à 55°C (B). Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 40°C à 1 bar.

Une production maximale d'H₂S par *Thermosipho japonicus* a été enregistrée à 55°C à pression atmosphérique au cours de cette étude. Sous pression, des activités métaboliques moindres, comprises entre 10 et 40%, ont été mesurées (figure 53). Ce résultat suggère une limitation de l'activité thiosulfato-réductrice de cette souche par le facteur pression. De plus, bien que la température de croissance optimale de cette bactérie soit proche de 70°C (Takai et Horikoshi, 2000), les activités métaboliques détectées à cette température étaient plus faibles que celles obtenues à 55°C pour une pression hydrostatique équivalente (90 bars) suggérant que les températures optimales de croissance ne correspondent pas aux températures optimales d'activité. Néanmoins, la nature piézophile de cette bactérie thiosulfato-réductrice a été confirmée par l'importante croissance bactérienne obtenue à 180 bars, pression hydrostatique proche de la pression optimale de croissance (200 bars ; Takai et Horikoshi, 2000) et pour laquelle une densité optique supérieure à 1,6 a été mesurée (voir figure 55 F). Cette valeur de DO est la plus élevée obtenue au cours de l'étude. En outre, une production élevée d'H₂S à 40°C et à 1 bar par cette souche (76%) (figure 53) et une croissance associée (voir figure 55 F) ont également permis d'abaisser la température minimale de croissance de cette bactérie. En effet, Takai et Horikoshi (2000) avaient initialement décrit cette bactérie comme incapable de se développer en dessous de 45°C. Par conséquent, le milieu de culture mis au point pour cette étude a permis, comme pour *P. mexicana*, d'étendre la gamme de température de croissance mais dans ce cas vers les températures basses, et a également confirmé l'influence de la composition du milieu sur les paramètres cardinaux des souches.

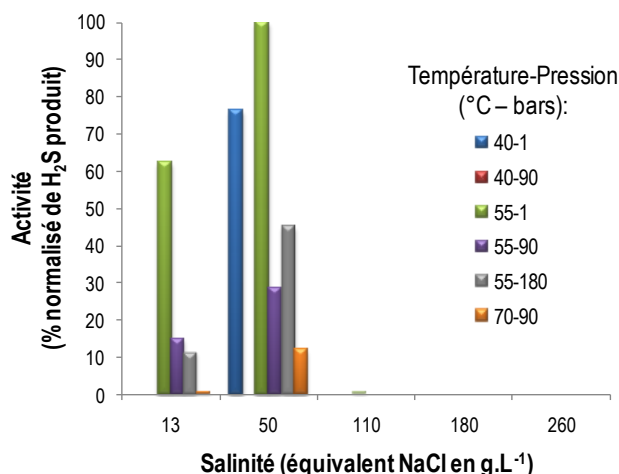


Figure 53. Activité métabolique normalisée de la bactérie thiosulfato-réductrice *Thermosipho japonicus* sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur l'activité maximale obtenue expérimentalement, ici pour un milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 55°C à 1 bar.

Les deux souches fermentaires utilisées ont produit les plus importantes quantités d'acétate sous pression (figure 54 A et B). Dans les conditions de croissance proches des conditions optimales de température et de salinité décrites pour ces deux souches (Dahle et Birkeland, 2006 ; Cayol et al., 1994), l'application d'une pression a permis une augmentation de l'activité métabolique. De ce fait, ces deux bactéries ont semblé bien adaptées d'un point de vue métabolique aux hautes pressions hydrostatiques et à la vie dans les environnements profonds. Elles peuvent, par conséquent, être considérées comme piézophiles (Bale et al., 1997 ; Yayanos et al., 1982). Alors que la nature piézophile de *Thermovirga lienii* tend à confirmer le caractère endogène de la bactérie pour l'environnement profond dont elle a été isolée, en l'occurrence un réservoir pétrolier, la piézophilie de *Halothermothrix orenii* suscite des interrogations car cette dernière a été isolée de sédiment de surface. L'une des hypothèses avancées repose sur l'halophilie de la souche. La résistance aux hautes pressions de *H. orenii* proviendrait de sa résistance aux fortes pressions osmotiques auxquelles elle est continuellement soumise dans son milieu hypersalé d'origine. Cette hypothèse contredit néanmoins les observations précédentes réalisées sur *Methanohalobium evestigatum*.

L'application d'une pression modérée (90 bars) a également permis de conserver la bactérie *T. lienii* active à 70°C (figure 54 A) alors que Dahle et Birkeland (2006) n'avait pas observé de croissance à cette température sous pression atmosphérique. Pour cette souche, une incubation sous pression a entraîné une augmentation de la température maximale de cultivabilité. A l'inverse, une diminution de la température minimale de croissance de 5°C par rapport à celle rapportée par Cayol et al. (1994) a été constatée pour la bactérie halophile *H. orenii* qui s'est révélée active à 40°C dans le milieu d'étude

utilisé en présence ou non de pression (figure 54 B). Comme pour *Desulfotomaculum geothermicum*, la gamme de croissance en fonction de la salinité des deux souches n'a donc pas été modifiée par l'application d'une pression. Toutefois, l'effet de la salinité sur la production d'acétate a été différent en fonction de la souche considérée. Pour *T. lienii*, il semblerait que la tolérance ou le besoin en sels de la souche varie avec le couple température/pression alors que la bactérie *H. orenii* semblerait plus sensible au paramètre pression uniquement. En effet, à pression atmosphérique, une augmentation de la salinité totale a provoqué une légère diminution de l'activité métabolique de *T. lienii* alors que sous pression, une augmentation de l'activité en présence de concentration plus élevées en sels a été observée pour les incubations réalisées aux températures des extrémités de sa gamme de croissance (40 et 70°C) (figure 54 A). De même pour la bactérie *H. orenii*, une meilleure activité à des teneurs élevées en sels (110 g.L⁻¹ équivalent NaCl) a été constatée sous pression élevée (180 bars) alors qu'une salinité plus faible (50 g.L⁻¹ équivalent NaCl) permettait une augmentation de l'activité sous pression modérée. Une variation significative de l'activité en fonction de la température a également été constatée pour cette bactérie.

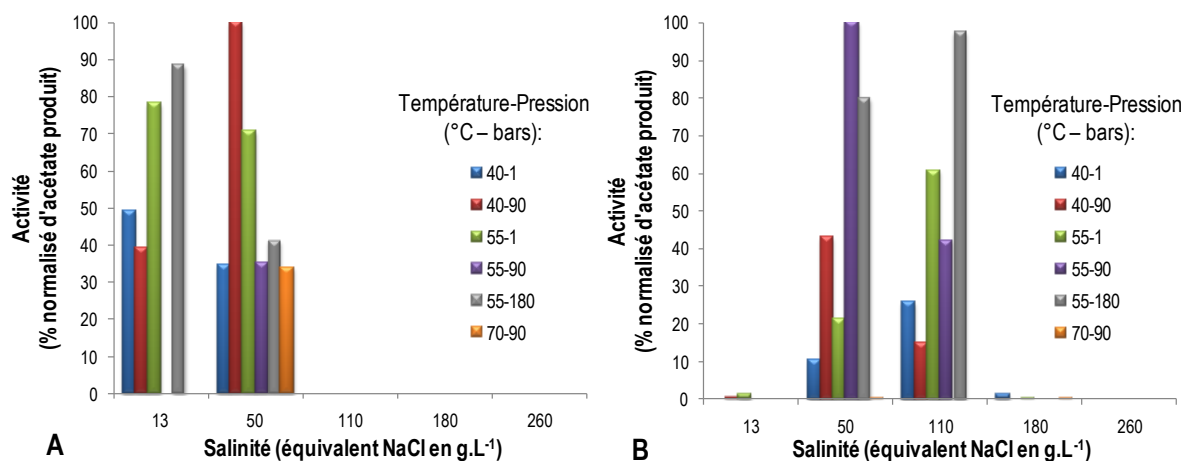
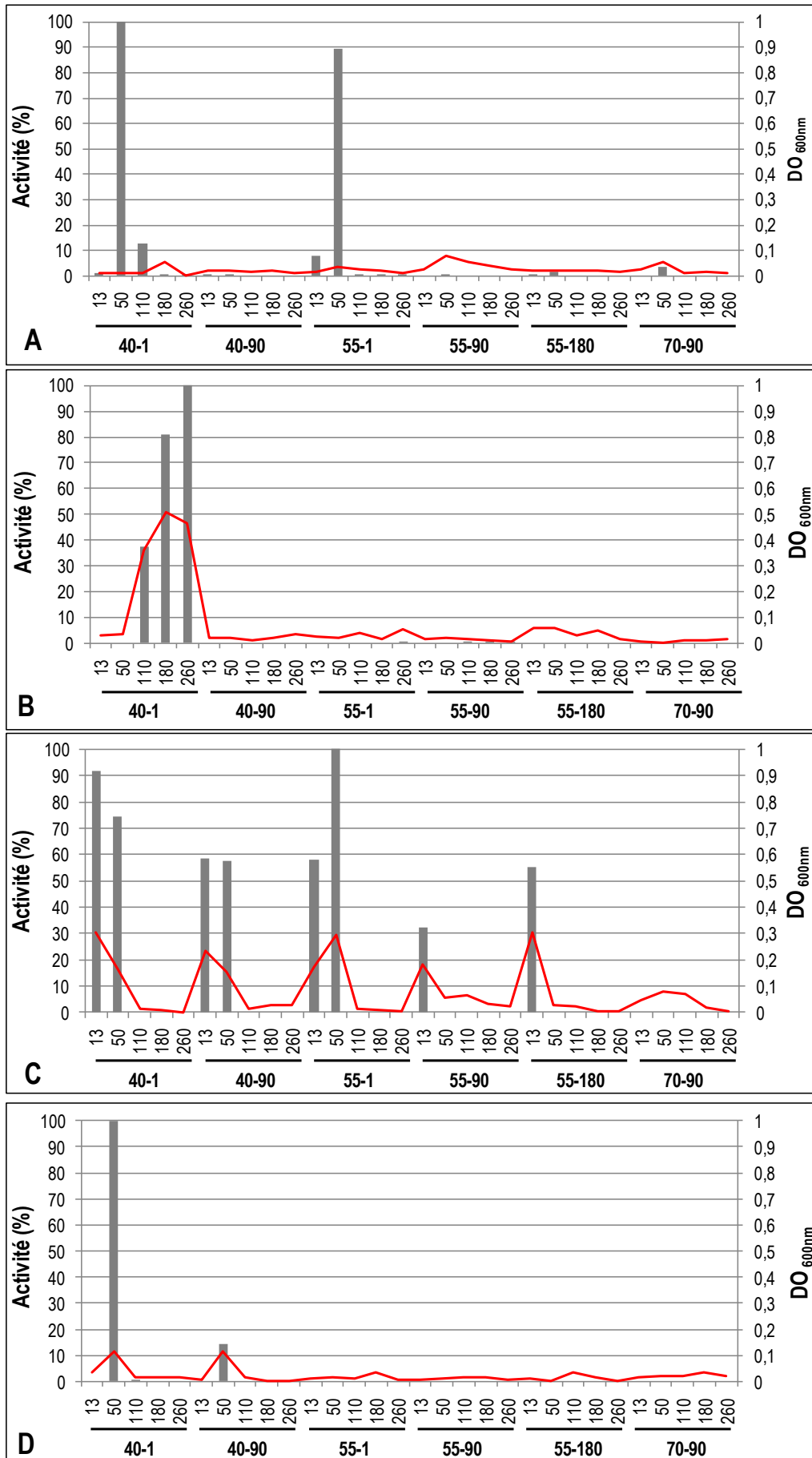


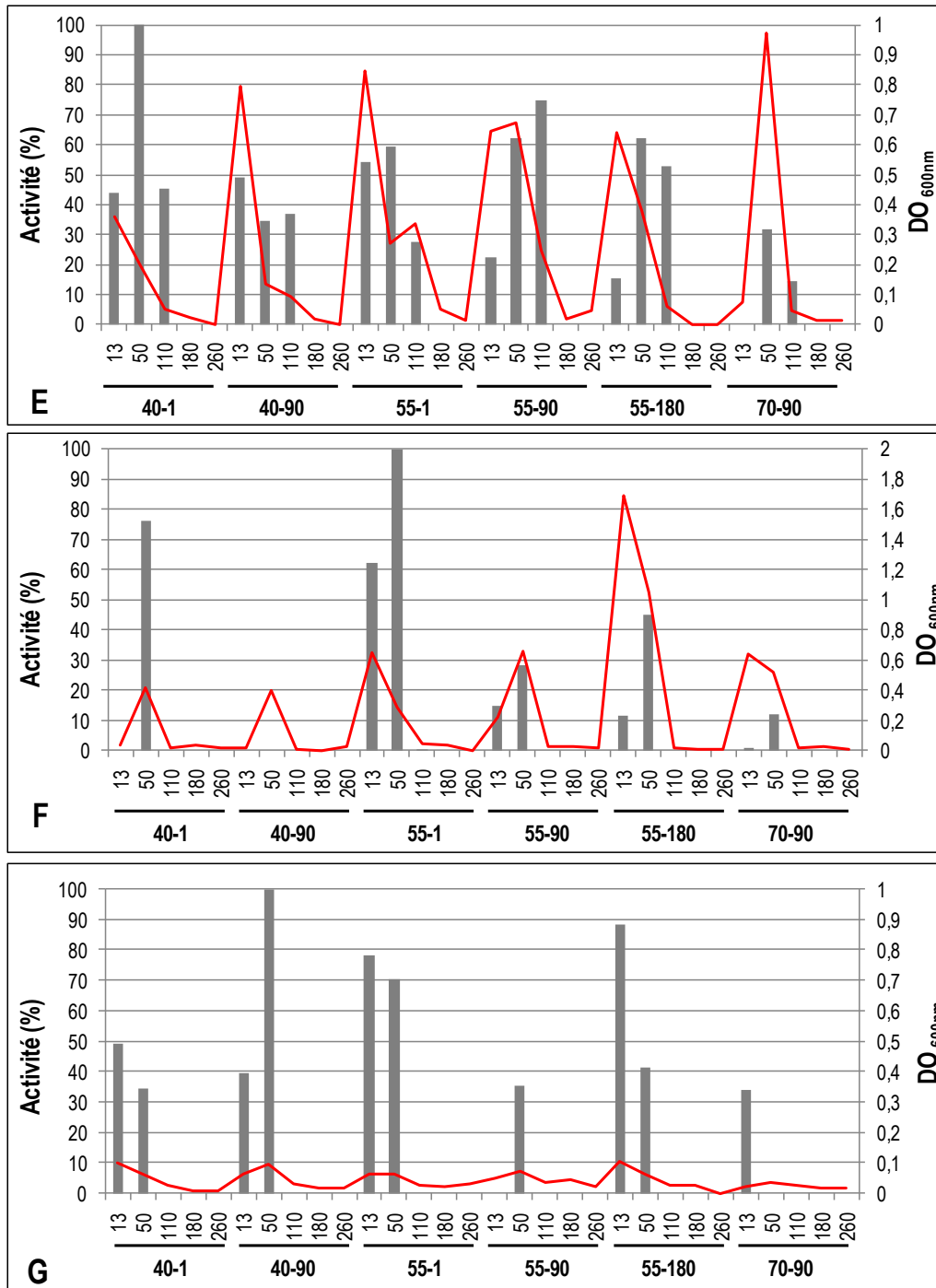
Figure 54. Activités métaboliques normalisées des bactéries fermentaires *Thermovirga lienii* (A) et *Halothermothrix orenii* (B) sous différentes conditions de température, pression et salinité. Les pourcentages d'activité ont été normalisés sur les activités maximales obtenues expérimentalement, pour *T. lienii* à partir du milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 40°C à 90 bars (A) et pour *H. orenii* à partir du milieu contenant une salinité équivalente à 50 g.L⁻¹ de NaCl et incubé à 55°C à 180 bars (B).

2. Croissance cellulaire et activité métabolique

Dans la majorité des cas, les activités métaboliques ont été associées à une production de biomasse (figure 55 B, C, D, E, F et H). Néanmoins, aucune corrélation linéaire n'a pu être établie entre les deux. En effet, des densités optiques (DO) équivalentes ont été retrouvées pour des activités métaboliques significativement différentes (figure 55 C conditions 3 et 5, D conditions 1 et 2) ou encore de fortes croissances ont été rencontrées dans des milieux ayant enregistré une activité relativement basse (figure 55 E condition 6 et F condition 5) et inversement (figure 55 G conditions 2 et 5). Les densités optiques mesurées n'ont donc pas reflété les activités métaboliques détectées et l'absence de croissance n'a pas obligatoirement signifié l'inactivité métabolique des souches (figure 55 A conditions 1 et 3 et G condition 6). Ainsi, une communauté microbienne pourrait rester métaboliquement active sans toutefois voir sa biomasse augmenter. En 1996, Wellsbury et al. avaient également montré qu'une activité bactérienne pouvait avoir lieu dans un environnement naturel sans être associée à une augmentation de densité cellulaire. Cette particularité a notamment été rencontrée chez les microorganismes anaérobies. Néanmoins, l'absence de DO pourrait également être expliquée par une lyse cellulaire naturelle, en relation avec les phases de croissance, et/ou artificielle provoquée par la dépressurisation des cultures sous pression. La perte cellulaire serait alors difficilement estimable biaisant les résultats obtenus *via* les mesures de croissance couramment utilisées (comptage, DO). En revanche, le milieu de culture réalise un enregistrement global de l'activité métabolique sur une période donnée. De ce fait, la mesure de l'activité métabolique n'est affectée ni par la quantité de biomasse ni par la dépressurisation des milieux justifiant l'utilisation de la notion d'activité plutôt que celle de croissance pour ce type d'études.

De façon logique, une distinction entre conditions optimales d'activité et conditions optimales de croissance a également été mise en évidence. En effet, pour certaines souches, les conditions d'incubation ayant permis l'acquisition des activités maximales ne correspondaient pas à celles favorisant une production massive de biomasse (figure 55 B, E, F et H). Ce phénomène a notamment été observé et confirmé pour les bactéries thiosulfato-réductrices *P. mexicana* et *T. japonicus* où les deux meilleures croissances cellulaires ont été mesurées sous pression démontrant de manière indiscutable leurs caractères piézophiles (figure 55 E condition 6 et F condition 5) alors qu'en revanche, leurs activités maximales ont été enregistrées à pression atmosphérique (figure 55 E condition 3 et F condition 1). Ces observations, en particulier, ont ainsi montré la nécessité de différencier les notions d'activité et de croissance cellulaire.





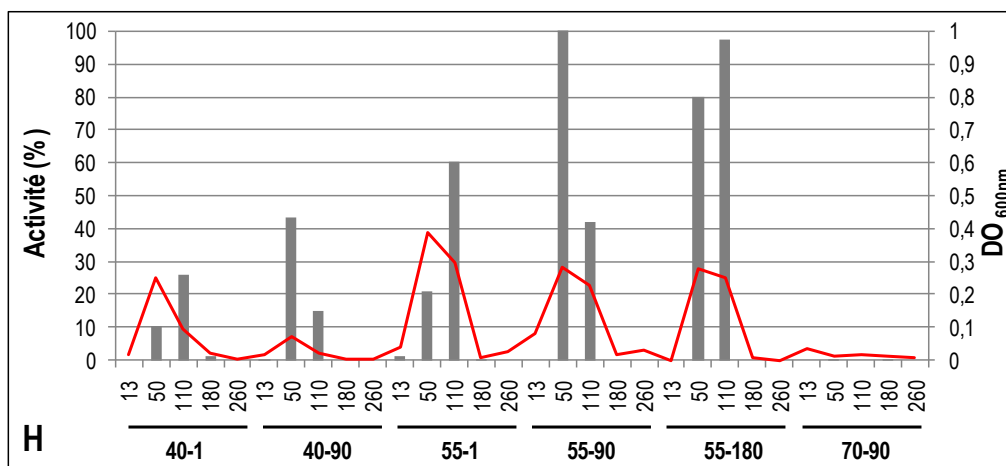


Figure 55. Activités métaboliques et croissances cellulaires mesurées après 30 jours d'incubation dans les six conditions expérimentales. En gris sont présentés les pourcentages d'activités normalisées et en rouges, les courbes de croissances cellulaires données en unité de DO à 600 nm. Les huit graphiques notés de A à H correspondent aux résultats obtenus pour *M. thermolithotrophicus* (A), *M. evestigatum* (B), *Desulfotomaculum geothermicum* (C), *D. profundus* (D), *P. mexicana* (E), *T. japonicus* (F), *T. lienii* (G) et *H. orenii* (H).

Certaines bactéries thiosulfato-réductrices, dont *T. japonicus*, sont capables de fermenter les sucres en présence de thiosulfate (Takai et Horikoshi, 2000, Ravot et al., 1996). Le thiosulfate peut ainsi être utilisé comme accepteur d'électron ce qui induit une augmentation de la croissance et une formation d'H₂S, composé majoritairement produit durant la croissance (Takai et Horikoshi, 2000). Cette activité métabolique (fermentation associée à une réduction du thiosulfate) a également été observée chez la bactérie thiosulfato-réductrice *P. mexicana* (figure 56 B). Néanmoins, sous certaines conditions, la voie de fermentation semble préférentiellement voire uniquement empruntée par les souches thiosulfato-réductrices étudiées. En effet, des concentrations d'acétate supérieures à celles d'H₂S ont été mesurées dans les milieux de *T. japonicus* incubés à 55 et 70°C sous une pression de 90 bars et une importante production d'acétate associée à une croissance bactérienne non négligeable (DO = 0,4 ; figure 55 F condition 2) dans un milieu dépourvu d'H₂S a été rencontrée lors de l'incubation de la même souche à 40°C sous une pression identique (figure 56 A). Une très faible production d'acétate par *P. mexicana* a également été constatée à 70°C sans formation conjointe d'H₂S (figure 56 B).

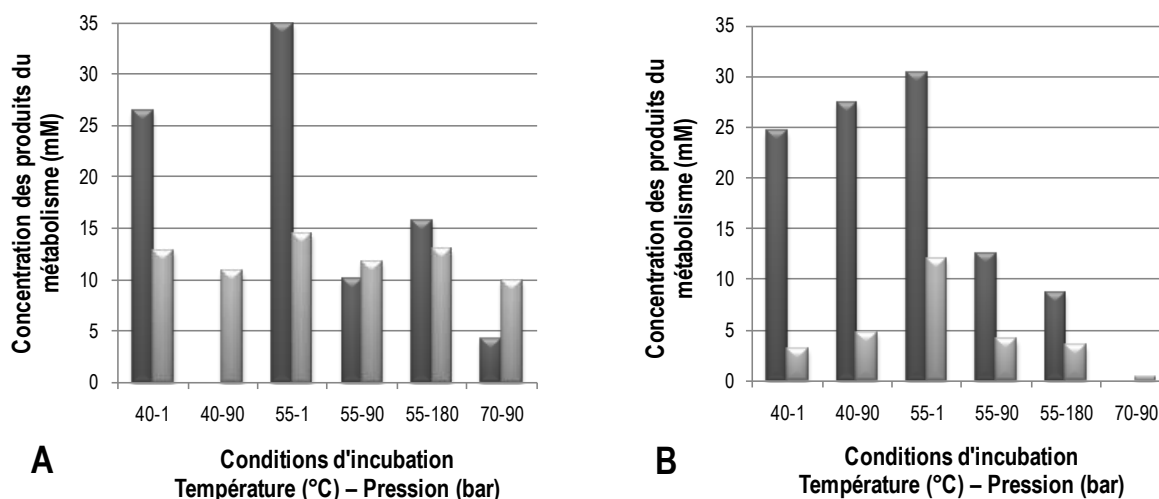


Figure 56. Concentrations en H₂S (gris foncé) et acétate (gris clair) produits par les souches *T. japonicus* (A) et *P. mexicana* (B) dans six conditions d'incubation différentes. Les dosages des produits du métabolisme ont été concernés uniquement les milieux contenant 50 g.L⁻¹ équivalent NaCl pour la bactérie *T. japonicus* et 13 g.L⁻¹ équivalent NaCl pour *P. mexicana*.

3. Influences des paramètres physicochimiques et de leurs interactions sur l'activité métabolique

L'objectif de cette expérimentation était de déterminer les effets des trois paramètres physicochimiques température, pression et salinité et de leurs interactions sur l'activité métabolique des huit souches microbiennes anaérobies étudiées à l'intérieur de quatre domaines d'étude contraints en utilisant un plan d'expérience, ici un plan factoriel complet. Ces domaines d'étude ont été précédemment définis dans le tableau 18 à partir des valeurs hautes et basses données aux différents paramètres. Il s'agissait des activités métaboliques comprises entre 40 et 55°C pour une gamme de pressions s'étendant de 1 à 90 bars et des teneurs en sels comprises entre 13 et 50 g.L⁻¹ équivalent NaCl pour le premier domaine, entre 50 et 110 pour le second domaine, entre 110 et 180 pour le troisième domaine et entre 180 et 260 pour le dernier domaine. La valeur des effets a été calculée par la multiplication de la matrice d'Hadamard et la matrice de résultat, autrement dit, l'activité normalisée des différentes souches obtenue pour les 8 expériences. Afin d'évaluer l'influence des trois paramètres et de leurs interactions sur les différentes souches, chaque effet a été divisé par la moyenne a_0 des activités métaboliques obtenues pour les 8 expériences, devenant un effet relatif, dans le but de s'affranchir de l'effet des souches elles-mêmes.

Dans le cadre des conditions choisies dans le plan d'expérience, une augmentation de la température a eu un effet négatif sur l'activité métabolique de la majorité des souches étudiées (les

deux méthanogènes et BSR ainsi que la fermentaire *T. lienii*) (figure 57 A). En revanche, des températures d'incubation plus chaudes ont été en faveur d'une augmentation de l'activité métabolique des bactéries *H. orenii* et des deux bactéries thiosulfato-réductrices. Cet effet était généralement croissant et a atteint son maximum dans le troisième domaine d'étude *i.e.* pour une salinité comprise entre 110 et 180 g.L⁻¹.

L'application d'une pression a induit une diminution de l'activité métabolique de la quasi-totalité des souches (figure 57 B). Néanmoins, une hausse des niveaux d'activité a été observée pour *P. mexicana*, *T. lienii* et *H. orenii* en fonction de la gamme de salinité étudiée prouvant ainsi le caractère piézophile de ces souches dans les domaines d'étude définis. Par exemple, une augmentation de l'activité de *P. mexicana* a été constatée sous pression conjointement à une augmentation des gammes de salinité alors que le phénomène inverse a été observé pour *H. orenii*.

Globalement, à l'exception du premier domaine d'étude (13 à 50 g.L⁻¹ équivalent NaCl), une augmentation de la teneur en sels a eu pour conséquence une forte diminution de l'activité métabolique (figure 57 C). Seule l'archée *M. evestigatus* a montré une activité positivement corrélée, d'un point de vue statistique, à de fortes teneurs en sels, ce qui s'explique par l'halophilisme extrême de la souche décrit par Zhilina et Zavarzin (1987).

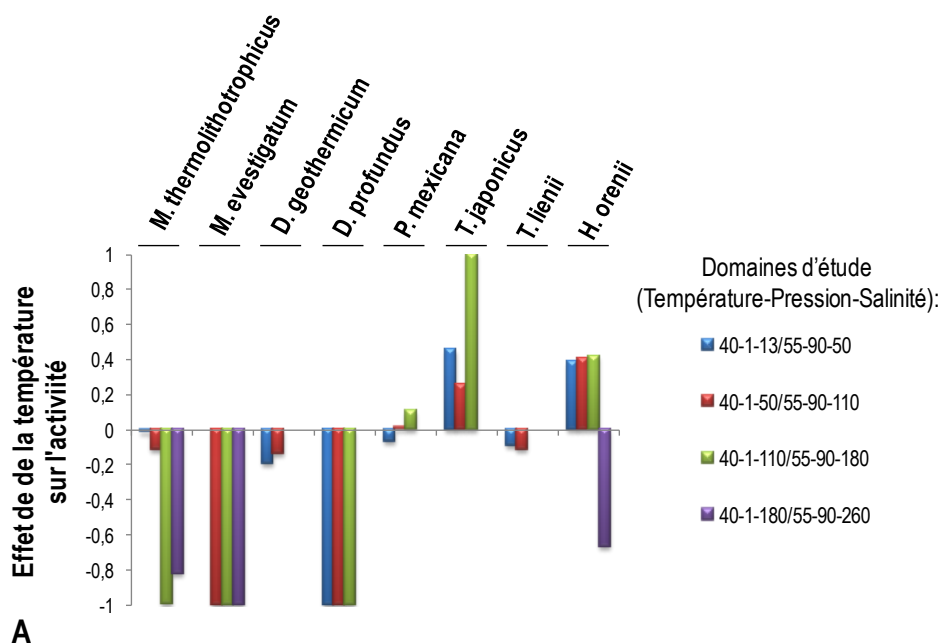
L'effet de l'interaction « Température » et « Pression » a été globalement positif (synergie), excepté pour les souches *D. geothermicum*, *T. japonicus* et *T. lienii* (figure 57 D). D'après les figures 57 A et B, pour les méthanogènes et *D. profundus*, l'activité métabolique était d'autant plus importante que les températures d'incubation et les pressions hydrostatiques exercées étaient basses. Pour *P. mexicana* et *H. orenii*, un effet synergique inverse a été observé. En effet pour ces deux souches, une augmentation de l'activité métabolique supérieure à une simple additivité des deux paramètres (température et pression) a été constatée. Un effet négatif de l'interaction « Température » et « Pression » ayant été observé pour *T. japonicus* et *T. lienii* (effet compétitif), ces deux paramètres ont une influence inverse sur l'activité métabolique. D'après les figures 57 A et B, pour *T. japonicus*, l'activité métabolique était d'autant plus importante que la température d'incubation était élevée et la pression était faible alors que l'inverse a été constaté pour *T. lienii*.

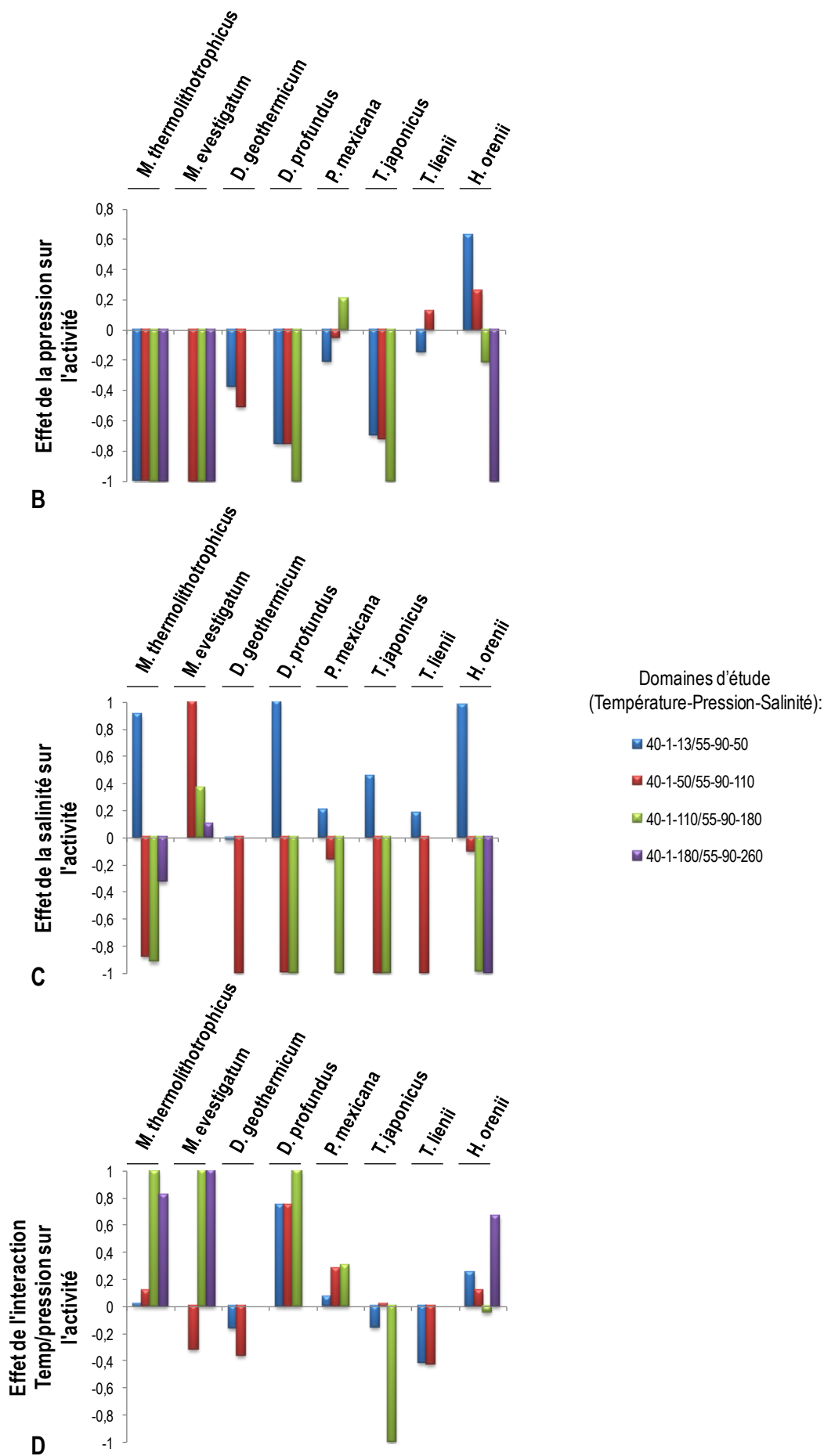
L'interaction « Température » et « Salinité » est négative pour *M. evestigatus* et *T. japonicus*, globalement positive pour les BSR et plus nuancée pour les cinq autres souches où l'effet de

l'interaction semble dépendre de la gamme de salinité du domaine d'étude (figure 57 E). Aucune tendance majeure n'a donc pu être dégagée.

Un effet essentiellement positif (synergie) a été trouvé pour l'interaction entre le facteur « Pression » et « Salinité » (figure 57 F). En effet, l'association d'une pression atmosphérique et d'une faible salinité a généralement conduit aux meilleures activités métaboliques pour les *M. thermolithotrophicus*, *D. geothermicum*, *D. profundus* et *T. lienii* (figure 57 B et C). Pour les bactéries *T. japonicus* et *H. orenii*, les activités ont été d'autant plus élevées que la pression d'incubation et les concentrations en sels du milieu étaient importantes.

L'interaction combinée des trois facteurs température, pression et salinité sur l'activité a eu un effet contrasté en fonction des domaines d'activité et des souches microbiennes considérées (figure 57 G). Un effet majoritairement positif a été observé pour *T. japonicus*, *H. orenii* et notamment pour *M. evestigatum*. Dans ce cas, alors que l'activité de *M. evestigatum* a été favorisée par de faibles températures, pression et salinité, l'inverse *i.e.* des conditions de température, pression et salinité élevées, a induit une augmentation d'activité de *T. japonicus*, *H. orenii*. Pour les souches *M. thermolithotrophicus* et *D. profundus*, un effet plutôt compétitif entre ces trois facteurs a été constaté.





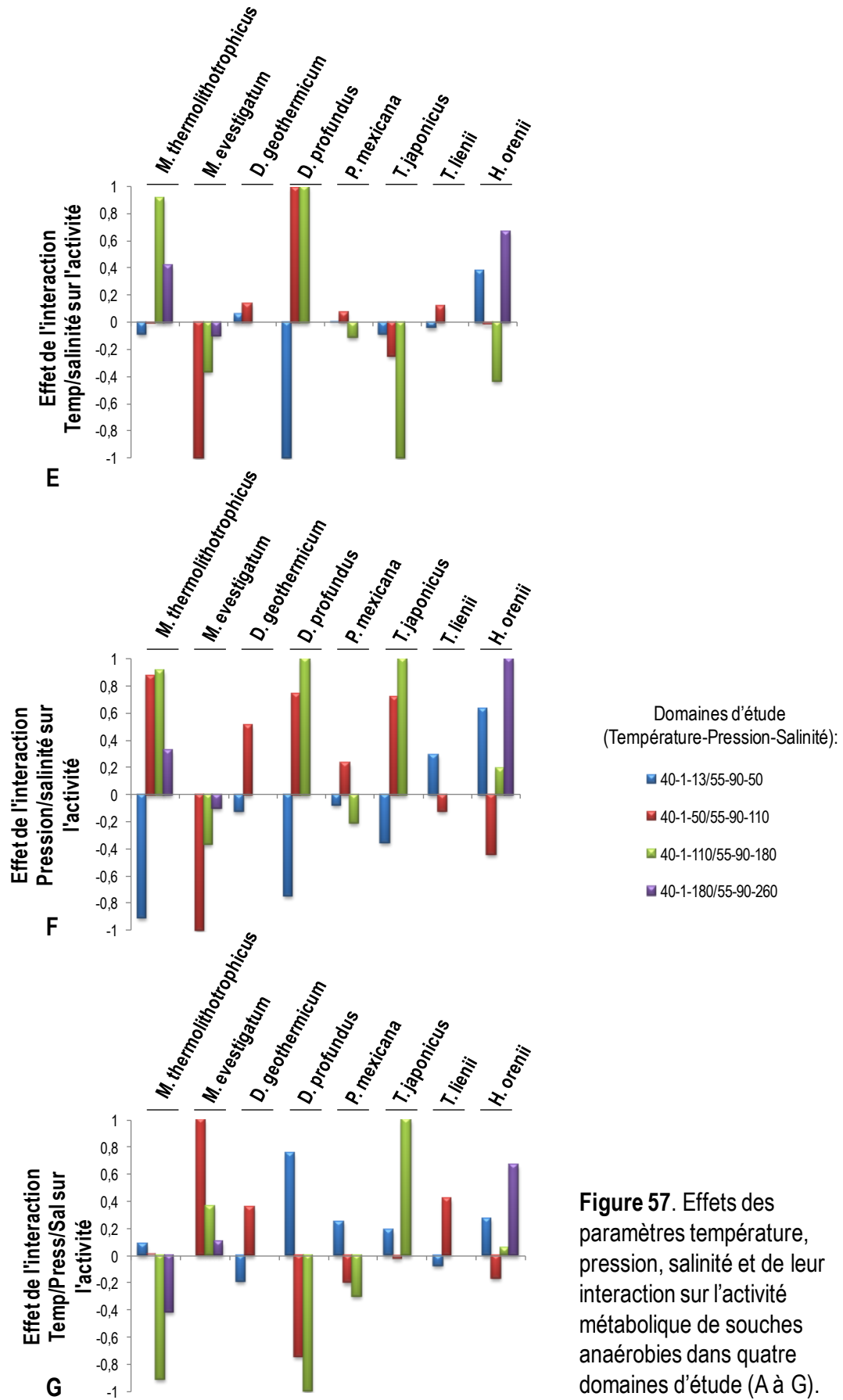


Figure 57. Effets des paramètres température, pression, salinité et de leur interaction sur l'activité métabolique de souches anaérobies dans quatre domaines d'étude (A à G).

Pour chaque domaine et pour chaque souche, une hiérarchisation de la valeur des différents effets a été réalisée (données non montrées). Ce classement a montré une modification de l'influence des différents paramètres physicochimiques et de leurs interactions sur l'activité métabolique en fonction des souches et des domaines d'étude considérés. En revanche, la pression a été constatée comme le paramètre ayant le plus d'effet sur l'activité de *M. thermolithotrophicus* pour l'ensemble des domaines étudiés. De plus, une observation comparable sur l'homogénéité de l'impact de la salinité sur l'activité de *H. orenii* a été faite. En effet, le paramètre de salinité ou une interaction associant la salinité à un second paramètre ont toujours eu une influence majeure sur l'activité de *H. orenii* et ce quel que soit le domaine d'étude ciblé.

4. Discussion :

Les six microorganismes anaérobies originaires d'environnements profonds testés dans ce travail avaient été préalablement définis comme au minimum halophiles (Bowers et al., 2009 ; Ollivier et al., 1994 ; Oren, 2006) et thermo-tolérants. Nos résultats ont montré qu'ils sont également au minimum piézo-tolérants, selon la définition de Kaye et Baross (2004), bien que pour *D. profundus*, seule une observation microscopique ait permis de constater le maintien de leur l'intégrité cellulaire et de leur présence dans les milieux de culture utilisés (données non montrées). En revanche, aucune généralisation n'a pu être réalisée pour les microorganismes halophiles de surface. Sur les deux souches étudiées, l'une a montré des prédispositions naturelles à la survie en milieu profond (*H. orenii*) alors que l'autre n'a toléré aucune pression (*M. evestigatum*) montrant que la machinerie cellulaire adaptée à la pression n'est pas universellement distribuée au sein du règne procaryotique. L'acquisition de cette propriété semble demander un effort d'adaptation de la part des microorganismes non piézophiles car la pression induit une modification des équilibres thermodynamiques et altère les rendements des réactions chimiques (Jaenicke et al., 1988) avec, notamment, une dissociation des complexes protéiques multimériques impliqués dans la réplication, la transcription et la traduction (Jaenicke et Zavodszky, 1990 ; Oger et Jebbar, 2010 ; Schulz et al., 1976).

L'observation, à de nombreuses reprises, de capacités culturales plus étendues que celles initialement décrites par les auteurs ont laissé sous-entendre une potentielle influence de la composition du milieu de culture sur certains paramètres cardinaux des souches tels que la température ou la salinité. En plus, du constat de Kaye et Baross (2004) sur une diminution de la température minimale de croissance en fonction du milieu utilisé, Abe (2007) avait également stipulé que la composition du milieu

de culture pouvait modifier les effets induits par une pression hydrostatique sur la croissance de microorganismes. Ce facteur, à la base de toute expérimentation, ne doit donc pas être négligé.

Comme montré dans la figure 55, la comparaison des conditions optimales de croissance et d'activité ont permis de suggérer une discordance de ces deux paramètres propres à chaque souche. En 2010, Bastias et Gentina avaient également observé ce phénomène dans des procédés de biolixivations. Dans les conditions optimales de croissance, les microorganismes semblent favoriser la production massive de biomasse qui mobilise la majorité de l'énergie disponible dans les cellules au détriment de l'activité métabolique. En revanche, lors d'un léger stress environnemental, la communauté procaryotique rassemble ses efforts pour la défense de l'intégrité des cellules qui pourrait se traduire par une augmentation de l'activité métabolique.

Comme indiqué dans le tableau 26, les augmentations de température, de pression et de salinité tendent globalement à diminuer l'activité métabolique des microorganismes dans les domaines définis par le plan factoriel confirmant les caractères essentiellement thermo-tolérant, halophile modéré et piézo-tolérant de la quasi-totalité des souches étudiées. Bien qu'une augmentation de pression induise généralement une réduction beaucoup plus rapide de la croissance microbienne que de l'activité procaryotique (Bale et al. 1997), il semblerait que l'application d'une pression sur une période relativement longue (30 jours) freine l'activité métabolique des différents types trophiques. Cette réduction des niveaux d'activité sous pression pourrait permettre de maintenir durablement les communautés microbiennes de subsurface dans des environnements profonds carencés en nutriments et en divers composés indispensables (N, P et autres éléments traces).

Les bactéries thiosulfato-réductrices et fermentaires sont apparues comme particulièrement bien adaptées aux conditions extrêmes (pressions et températures extrêmes). D'ailleurs, l'activité métabolique des fermentaires semble être stimulée sous des conditions de hautes températures et pressions (tableau 26). En se basant sur la théorie de Fredrickson et Balkwill (2006), les métabolismes fermentaires pourraient produire des composés biologiques de faibles poids moléculaires, à la base de la chaîne trophique, directement utilisables par les procaryotes réalisant une respiration anaérobie dans les écosystèmes salés profonds.

De manière générale, l'interaction Température/Pression est synergique vis-à-vis de l'activité métabolique des différentes souches (tableau 26). Une résistance accrue de ces microorganismes aux températures élevées est apparue sous pression. Ce phénomène fréquemment rencontré chez les

microorganismes hyperthermophiles (Erauso et al., 1993 ; Marteinsson et al., 1999) est expliqué par les effets mécaniques antagonistes qu'exercent les hautes températures et les hautes pressions sur les membranes biologiques (Bartlett, 2002 ; Oger et Jebbar, 2010). En effet, alors qu'une augmentation de la température fluidifie les membranes, l'application d'une pression les rigidifie en augmentant l'ordre des chaînes hydrocarbonées.

Une variabilité de la résistance à la salinité a été observée pour chaque souche en fonction des différentes conditions de température et de pression. L'étude des tendances associant la salinité aux deux autres paramètres physicochimiques a mis en évidence des effets majoritairement synergiques de l'interaction double Pression/Salinité et triple Température/Pression/Salinité sur l'activité métabolique (tableau 26). D'un point de vue physiologique, une augmentation de la température ou de la salinité entraînent une déshydratation cellulaire par la sortie de l'eau intracellulaire. Afin de lutter contre le stress osmotique, un mécanisme de résistance impliquant soit une accumulation de KCl (« stratégie high-salt-in ») soit une exclusion des sels et une synthèse et/ou accumulation d'osmolytes et autres solutés organiques « compatibles » (« stratégie low-salt-in ») est alors mis en place (Bowers et al., 2009 ; Grant, 2004 ; Oren, 2008). A l'inverse de la pression osmotique, une augmentation de la pression hydrostatique n'induit pas une modification de la pression de turgescence de la cellule, *i.e.* de la pression différentielle à travers la membrane cellulaire entre les potentiels hydriques interne (cellule) et externe (milieu environnemental) (Oger et Jebbar, 2010). Néanmoins, une accumulation de composés organiques de faibles poids moléculaires peut également être observée en réponse à un stress thermique et sous pression (Yancey et al., 2005). Ces solutés compatibles, en référence au fait qu'ils peuvent être accumulés jusqu'à des concentrations très élevées sans perturber fortement l'activité enzymatique de la cellule (Brown, 1976), possèdent de plus des propriétés protectrices (Yancey et al., 2005) et favorisent le repliement des protéines et la stabilisation des complexes macromoléculaires (Oger et Jebbar, 2010 ; Yancey et al., 2005). Par conséquent, il se pourrait que différents mécanismes de résistance contre le stress osmotique, notamment au niveau de la nature des solutés compatibles, expliquent les différences de sensibilité à la salinité observées entre les différentes souches au cours de cette étude.

Tableau 26. Effets des paramètres température (T), pression (P), salinité (S) et de leur interaction sur l'activité métabolique (A) dans les conditions du plan factoriel pour les huit souches microbiennes étudiées.

	<i>M. thermolithotrophicus</i>	<i>M. evestigatum</i>	<i>D. geothermicum</i>	<i>D. profundus</i>	<i>P. mexicana</i>	<i>T. japonicus</i>	<i>T. lienii</i>	<i>H. orenii</i>
Effet de T sur A	-	-	-	-	+	+	-	+
Effet de P sur A	-	-	-	-	+	-	+	+
Effet de S sur A	-	+	-	-	-	-	-	-
Effet de TP sur A	Sy (-)	Sy (-)	C	Sy (-)	Sy (+)	C	C	Sy (+)
Effet de TS sur A	+/-	C	Sy (-)	Sy (-)	+/-	C	+/-	+/-
Effet de PS sur A	Sy (-)	C	Sy (-)	Sy (-)	C	Sy (-)	+/-	Sy (+)
Effet de TPS sur A	C	Sy (-)	+/-	C	C	Sy (-)	Sy (+)	Sy (+)

TP, TS, PS et TPS : interactions Température/Pression, Température/Salinité, Pression/Salinité et Température/Pression/Salinité

+ : effet positif, - : effet négatif, Sy : effets synergiques, C : effets compétitifs, +/- : effets variables,

Un effet est considéré comme synergique lorsque que les effets de chaque paramètre de l'interaction vont dans le même sens (même tendance).

Un effet est considéré comme compétitif lorsque que les effets de chaque paramètre de l'interaction sont opposés.

5. Conclusion

Dans cette étude, le comportement adopté par huit souches microbiennes possédant les trois types trophiques les plus fréquemment rencontrés dans les écosystèmes de subsurface ont été décrits en fonction des variations combinées des paramètres de température, de pression et de salinité. Bien que les différentes souches aient été préalablement mises en culture dans des milieux dédiés pour cette étude dans des conditions de température et de salinité proches de leurs conditions optimales de croissance décrites dans la littérature, aucune adaptation spécifique aux différentes salinités ni au paramètre de pression n'a été en revanche réalisée. Ainsi, réaliser une adaptation préalable des souches aux différents paramètres physicochimiques étudiés pourrait conduire à de meilleures activités, par exemple en réalisant des séries de pré-culture sous pression. Ceci aurait pu, en théorie, limiter un éventuel biais du au manque d'adaptation (ou à la perte de cette adaptation) en réalisant des croissances répétées à pression atmosphérique. De plus les demandes physiologiques et bioénergétiques nécessaires à la mise en place de mécanismes de résistance adéquats pour lutter contre une condition extrême semble limiter les capacités adaptatives des cellules pour la prise en charge d'une condition extrême additionnelle. Toutefois, cette étude a montré que les souches de subsurface possèdent des capacités de résistance et d'adaptation spontanées et innées à faire face à des pressions hydrostatiques élevées et suggère que différents mécanismes de lutte contre la pression osmotique devaient exister pour expliquer la variabilité de sensibilité des souches à la salinité par rapport aux modifications de température et de pression. Ce travail a également mis en évidence une meilleure résistance des métabolismes thiosulfato-réducteurs et fermentaires aux hautes pressions. En outre, cette étude a permis de suggérer que les paramètres cardinaux des microorganismes pouvaient être influencés par les milieux de culture utilisés et surtout que les conditions optimales de croissance différaient des conditions optimales d'activité. Les notions d'activité et de croissance doivent donc être distinguées l'une de l'autre.

Cette étude ayant traité des effets combinés de trois paramètres physicochimiques sur huit souches microbiennes distinctes, seul un domaine d'étude restreint a pu être abordé. Alors que pour *M. vestigatum*, la gamme des paramètres étudiés s'est révélée suffisante pour représenter les tendances de la souche, pour les autres, des activités métaboliques potentiellement plus importantes ainsi que des capacités physiologiques inattendues auraient pu être rencontrées dans des domaines voisins de température et de pression (intermédiaires et plus élevées). Cette étude exploratoire a néanmoins permis de cribler et de cibler les souches et les domaines d'études intéressants pour de futures recherches plus approfondies dans la même thématique. En l'occurrence *P. mexicana* s'est révélée

posséder des capacités physiologiques surprenantes et très intéressantes d'un point de vue adaptatif. En effet, cette bactérie s'est montrée capable d'atteindre des niveaux d'activité significatifs sur un large panel de conditions. En effet, une activité métabolique a été détectée pour cette bactérie dans les différentes conditions de température et de pression appliquées au cours de cette étude et en présence de 13 à 110 g.L⁻¹ de sels. Cette souche pourrait être un bon modèle pour l'étude de l'influence de ces trois paramètres et de leurs interactions sur sa croissance, son activité métabolique et ses mécanismes de résistance dans des conditions imposées dans les environnements profonds.

Pour chaque souche, les activités métaboliques ont été normalisées sur le maximum d'activité détectées afin de s'affranchir des problèmes d'estimation liés aux différentes constantes notamment celles liées au pK de l'H₂S basée sur l'équation de Millero (1982). Cette équation, utilisée dans notre étude pour estimer le pK de l'H₂S jusqu'à une concentration de 260 g.L⁻¹, n'a été vérifiée par l'auteur que pour des concentrations inférieures à 50 g.L⁻¹. Au delà de cette salinité, les quantités d'H₂S produits ont été, dans certains cas, surestimées (prélèvements non acidifiés) car les valeurs obtenues étaient supérieures aux valeurs théoriquement attendues. Néanmoins, une surestimation de l'activité ne contredit ou ne nuance pas les résultats acquis. Par conséquent, la fermentation préférentielle des bactéries thiosulfato-réductrices dans certaines conditions « défavorables » (température élevée, pression hydrostatique, salinité) plutôt que la respiration anaérobie pour se développer reste vrai.

L'avantage majeur d'un plan d'expérience réside dans l'étude d'un grand nombre de facteurs grâce à un minimum d'expérience. Par ailleurs, l'utilisation d'un plan factoriel complet permet d'étudier un système sans connaissance préalable de ce dernier car aucune interaction, même la plus faible (interaction triple), n'est négligée. En cela, les résultats acquis par l'analyse statistique *via* le plan factoriel complet sont robustes. L'une des critiques qui peut être énoncée au sujet de ce travail réside dans l'absence d'expérience réalisée en double ou en triple. Cependant cette étude n'avait pas pour but de distinguer les subtilités de chaque métabolisme et de chaque souche. Seule les grandes tendances ont été recherchées. De ce fait, le nombre conséquent de points obtenus pour chaque métabolisme ($n = 60$) et à un niveau plus individuel, pour chaque souche ($n = 30$) nous est apparu suffisant pour réaliser notre étude. Ainsi, il a pu être constaté qu'une augmentation de la température ou de la pression avaient tendance à diminuer l'activité métabolique des souches étudiées alors que la tendance inverse a été observée pour les bactéries fermentaires et thiosulfato-réductrices. A l'exception de l'archée halophile extrême *M. evestigatus*, une augmentation de la salinité au-delà de 50 g.L⁻¹ équivalent NaCl entraînait statistiquement une chute drastique de l'activité des microorganismes. Un effet globalement synergique de la température et de la pression sur l'activité métabolique a également été détecté. Il en

a été de même pour l'interaction double « Pression » et « Salinité » ainsi que pour l'interaction triple. La perspective directe de ce travail sera de statuer sur la significativité des différents effets sur l'activité métabolique de chaque souche.

Conclusions et perspectives

Bien qu'encore largement méconnus, les environnements terrestres profonds attirent de manière croissante l'attention des communautés scientifiques et industrielles. Les environnements de subsurface sont composés de formations géologiques hétérogènes complexes dans lesquelles se déroulent des cycles biogéochimiques d'importance majeure. Ces milieux profonds renferment un certain nombre de ressources (énergies fossiles, minerais...) et constituent des environnements de stockage potentiels (CO₂, déchets nucléaires...). Les conditions extrêmes de température, salinité et pression rencontrées dans certains compartiments profonds en font des biotopes uniques et atypiques pour l'étude de la biodiversité microbienne des environnements continentaux.

Ce travail a été divisé en deux parties distinctes. Dans le premier volet de l'étude, l'objectif a été de caractériser, d'un point de vue microbiologique, quatre formations sédimentaires profondes datant du Trias situées à l'aplomb du forage EST433 au centre de la zone de transposition du laboratoire souterrain de Meuse/Haute Marne (ANDRA, France). L'analyse de la diversité a été réalisée en associant (i) une approche culturelle large ciblant préférentiellement les métabolismes majoritairement retrouvés en milieu profond, par la recherche de la présence d'une communauté microbienne potentiellement viable et (ii) une approche moléculaire menée soit directement sur des échantillons de roches dans leurs états initiaux soit sur ces roches préalablement incubées dans des milieux d'enrichissement. Deux stratégies complémentaires ont été mises en œuvre pour le stockage des échantillons de roche sous forme de carottes, l'une conventionnelle à pression atmosphérique et l'autre sous haute pression (190 bars). Dans chaque cas, la biodiversité a été analysée à l'aide de différentes techniques moléculaires (DGGE, CE-SSCP, clonage, séquençage). Le second volet de ce travail de thèse s'est intéressé aux effets combinés de trois paramètres physico-chimiques (température, pression et salinité) sur l'activité métabolique de huit microorganismes anaérobies, halophiles et thermotolérants, voire thermophiles afin de mieux appréhender leur comportement au cours d'un enfouissement géologique et à terme de déterminer les facteurs limitants pour chacun de ces métabolismes. Pour cette étude, les souches microbiennes sélectionnées possédaient l'un des trois métabolismes fréquemment rencontrés en subsurface, *i.e.* la méthanogénèse, la réduction des composés soufrés en distinguant la sulfato-réduction de la réduction des thiosulfates et la fermentation. De plus, dans le but d'identifier les principales tendances des différents effets des paramètres sur les activités métaboliques, une analyse statistique par l'élaboration d'un plan factoriel complet (plan d'expérience) a été réalisée sur la base des activités métaboliques des différentes souches dans quatre domaines d'étude distincts.

Caractérisation microbiologique des formations sédimentaires terrestres profondes

La recherche de microorganismes cultivables séquestrés dans différentes formations sédimentaires terrestres profondes du Trias s'est révélée peu aisée et infructueuse. En effet, aucun procaryote n'a été isolé malgré l'application de multiples essais d'enrichissements ($n > 400$) réalisés au cours de cette thèse. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence de microorganisme endogène cultivable :

- Les milieux d'enrichissement et les conditions d'incubation appliquées ont pu être inadaptés aux besoins physiologiques des organismes autochtones.
- Les procaryotes endogènes des formations ont pu présenter une croissance cellulaire lente (les temps d'incubation les plus longs étant d'environ 12 mois) ne permettant pas d'être détectés à l'aide des outils optiques actuellement disponibles. Les échecs de culture seraient alors le reflet de faux négatifs.
- Les bactéries endogènes se trouvaient dans un état viable mais incultivées sous les conditions actuelles de mise en culture ou dans d'autres formes cellulaires quiescentes. Différents stress environnementaux, expérimentaux ou combinant les deux ont pu induire la formation de cellules microbiennes végétatives.
- Une distribution hétérogène des microorganismes au sein des formations sédimentaires associée à de faibles densités cellulaires ont également diminué les probabilités de rencontrer des bactéries viables.
- Enfin, les compartiments géologiques profonds étudiés pourraient ne renfermer aucune bactérie viable. En effet, il y a 50 millions d'années environ, la température *in-situ* des compartiments profonds du Trias étudiés a atteint les $90 \pm 5^\circ\text{C}$ et cette température associée aux fortes salinités a pu provoquer une paléostérilisation (figure 57, aires violettes). Les précédents travaux menés sur les écosystèmes pétroliers par différentes équipes à travers le monde (Bernard et al., 1992; Grassia et al., 1996 ; Philippi, 1977 ; Wilhelm et al., 2001) ont suggéré que les formations sédimentaires ayant atteint, au cours de leur histoire géologique, des températures supérieures à 80°C seraient dépourvues de toute trace de vie procaryotique. Les conditions de salinité et de température *in-situ* placent les compartiments géologiques du Trias étudiés à proximité d'une zone de non-cultivabilité, voire de non-vie (figure 57, zones jaune). De plus, la structure et les conditions physico-chimiques extrêmes des roches ont pu interdire toute recolonisation microbienne de ces environnements.

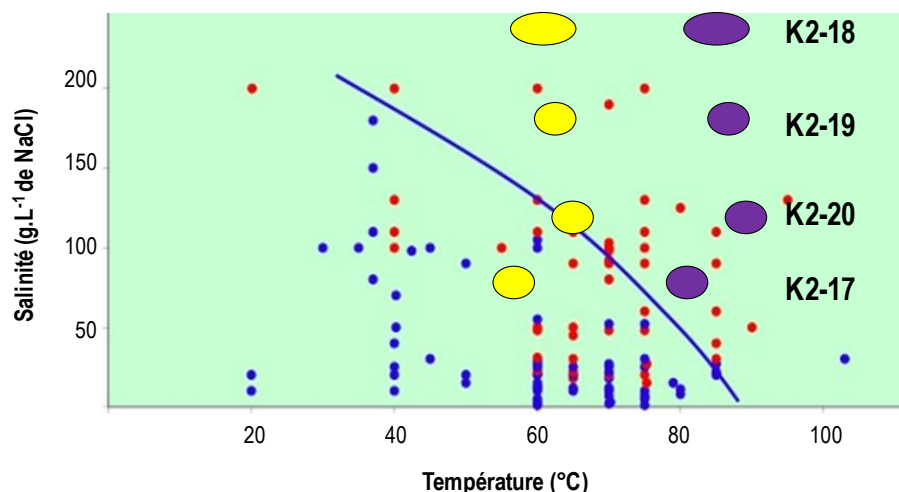


Figure 57. Distribution des formations sédimentaires triasiques profondes en fonction de leurs paramètres de température et de salinité *in-situ* actuels (zones en jaune) et de leurs paléo-températures (zones en violet) dans la représentation hypothétique de limite de vie (courbe bleue) des eaux de gisements pétroliers (selon Bernard et al., 1992 modifié par Magot et Ollivier, extrait d'Alazard et al., 2010). Les points bleus signalent la présence et les rouges l'absence de microorganismes dans les milieux étudiés.

Une explication alternative, basée sur les travaux de Krumholtz (1997), a aussi été donnée. Les échantillons de roches qui nous ont été alloués pour nos recherches pourraient se situer dans les zones stériles des formations. En effet, ces derniers se situaient dans des parties éloignées des interfaces aquifères/aquitards, zones considérées comme plus propices à la pérennité d'une communauté microbienne viable.

L'absence d'isolats et les faibles quantités d'ADN environnementaux extraits à partir des quatre formations sédimentaires du Trias ont suggéré la présence d'une faible biomasse microbienne. La présence de densités cellulaires réduites avait également été rencontrée dans d'autres écosystèmes terrestres profonds (Gérard et al., 2009 ; Onstott et al., 2003 ; Pedersen et al., 2008 ; Zhang et al., 2005). Toutefois, aucune indication n'a pu être obtenue sur l'activité métabolique et sur l'intégrité cellulaire des membres de cette population. En effet, les extraits d'ADN génomiques ont pu provenir de bactéries métaboliquement actives ou en dormance comme de molécules d'ADN fossiles contenues dans des cellules mortes entières ou adsorbées sur les particules minérales des différentes matrices environnementales.

Les différents outils moléculaires (DGGE, CE-SSCP, banques de clones) ont mis en évidence, pour chaque formation triasique profonde, une diversité pauvre et inattendue composée de microorganismes appartenant principalement au domaine *Bacteria* et pour la plupart aérobies,

mésophiles et peu tolérants aux salinités élevées. Cette communauté bactérienne, présentant au premier abord des caractéristiques incompatibles avec les spécificités des milieux étudiés, ont cependant été retrouvées dans divers écosystèmes de subsurface ainsi que dans des biotopes extrêmes (température, faible disponibilité de l'eau sous forme liquide, oligotrophie, présence de métaux) nécessitant le développement de stratégies de survie cohérentes avec une potentielle origine autochtone des organismes. En outre, la majorité des séquences bactériennes a été affiliée aux *Proteobacteria*, phylum largement retrouvé dans les environnements profonds, et aux *Firmicutes*, dont de nombreuses espèces ont la capacité de survivre sous forme de spores. Bien que la plupart des séquences aient été fortement apparentées à des bactéries cultivées (> 97% de similarité de séquences), cette particularité n'a en rien interféré avec leurs potentielles origines endogènes. En effet, l'analyse de l'eau du Trias a révélé que cette dernière était composée d'une eau de mer ancienne évoluée et d'une eau beaucoup plus récente d'origine continentale ou météoritique. Cette paléo-recharge des eaux du Trias se serait produite en condition climatique froide et serait datée du quaternaire. Par conséquent, la communauté procaryotique détectée pourrait provenir (i) des formations ciblées, (ii) des zones de recharge de l'aquifère du Trias se situant uniquement au niveau des zones de failles et d'affleurement qui, dans notre étude, pourraient en partie dériver de la fonte des glaces formées lors de la dernière glaciation du Pléistocène, il y a moins d'un million d'années et (iii) des compartiments géologiques supérieurs. Les microorganismes seraient ainsi drainés vers les parties profondes de la croûte terrestre via les fluides naturels circulants. Par conséquent, une fraction des séquences seraient alors dérivées de microorganismes plus récents que les formations étudiées mais éloignés de l'époque actuelle.

D'un point de vue méthodologique, l'étude d'environnements terrestres profonds a nécessité la réalisation de multiples témoins de contamination essentiels pour distinguer les microorganismes allochtones des potentiels autochtones. Les témoins de contamination ont été réalisés pour chaque étape de ce travail et ainsi une banque de contaminants a été obtenue en recensant les séquences des différents contaminants détectés par l'approche moléculaire mais également par l'approche culturelle traditionnelle. De plus, une évaluation des méthodes d'extraction directe d'ADN utilisées a été réalisée afin de vérifier l'adéquation et l'efficacité des procédures sur les échantillons traités. En effet, chaque procédure d'extraction a semblé être influencée, de manière différente, par la structure et la texture des roches. Pour chaque échantillon naturel, des modifications dans la structure des communautés bactériennes ont été observées en fonction de la méthode d'extraction d'ADN. Par conséquent, l'utilisation parallèle de plusieurs procédures d'extraction a permis une représentation plus exhaustive de la communauté microbienne présente dans les différentes formations sédimentaires profondes.

Toutefois, pour étudier l'évolution d'une communauté au cours du temps et comparer la diversité contenue dans différents échantillon, l'utilisation d'un seul et unique protocole d'extraction a été recommandé afin de limiter les biais propres à chaque méthode. Différents couples d'amorce ont également été testés afin d'utiliser des amorces adaptées pour détecter la diversité séquestrée dans les quatre compartiments géologiques profonds. La technique de DGGE s'est révélée adaptée aux environnements profonds présentant une diversité pauvre. De plus, la récurrence de résultats identiques entre les données de DGGE et des banques de clones (identification des séquences de bandes/clones majoritaires) a montré la robustesse et la cohérence des résultats acquis par ces deux méthodes. Enfin, des modifications notables dans la structure des communautés bactériennes ont été constatées en fonction du mode de conservation appliqué aux échantillons (haute pression/pression atmosphérique). La composition de la population a également semblé dépendante de la durée d'incubation et non du milieu d'enrichissement utilisé suggérant, ici, que les milieux de culture joueraient plutôt le rôle de tampon de désorption.

Différentes perspectives expérimentales peuvent être imaginées à partir des données acquises et des réflexions menées au cours de cette étude exploratoire. Tout d'abord, il semble important d'évaluer l'impact des procédures de conservation des échantillons de roches sur la structure des communautés microbiennes d'échantillons originaires d'environnements profonds et de mettre au point des outils d'échantillonnage adaptés aux études de géomicrobiologie et des méthodes robustes d'évaluation d'une potentielle contamination microbienne exogène. D'autre part, le développement de nouvelles stratégies d'enrichissement réalisées au laboratoire mais également directement dans l'environnement (dans la mesure du possible) semble indispensable. Ainsi, il pourrait être imaginé des cultures sous pression dans des chimostats en culture continue où différents paramètres tels que le pH, la température, la pression hydrostatique, la concentration en gaz et en nutriments, pourraient être maîtrisés et modifiés. En effet, l'utilisation d'un réacteur gas-lift s'est avérée performant pour l'étude de population en culture mixte et l'isolement de nouvelles espèces bactériennes à partir d'échantillon de cheminée hydrothermale (Postec et al., 2007). De plus, des matrices enrichies en nutriments ou des supports artificiels pourraient également faire l'objet de colonisation *in-situ* (Hobel, 2004). L'un des futurs axes de recherche pourrait s'intéresser à la colonisation microbienne de carottes de roches intègres, de structure et de texture différentes, par percolation de fluide sous pression ainsi qu'à l'influence de la présence d'une zone d'interface aquifère/aquitard sur l'installation pérenne d'une communauté microbienne. De plus, il apparaît utile de réaliser de nouveaux inventaires moléculaires sur des échantillons issus d'autres formations sédimentaires profondes et plus superficielles afin de mieux caractériser la biodiversité de ces écosystèmes et mieux appréhender les mécanismes biotiques

et abiotiques se déroulant *in-situ*. En plus de l'utilisation d'amorces ciblant des gènes génériques tels que les gènes codant l'ARNr 16S bactérien et archaéen, l'aspect fonctionnalité des écosystèmes pourra également être abordé *via* la recherche de différents gènes de fonction. Afin de s'affranchir des faibles quantités de matériels génétiques disponibles dans les biotopes terrestres profonds, une amplification préalable des génomes entiers par la technique MDA (Multiple displacement amplification) pourrait être envisagée ce qui pourrait potentiellement servir de base à une approche de métagénomique. Néanmoins, l'un des principaux inconvénients de l'approche moléculaire réside dans l'absence d'information sur l'intégrité et la viabilité cellulaire. De ce fait, il semble important de réfléchir sur des techniques capables de différencier la biodiversité issue de microorganismes entiers et viables de celle issue d'une communauté fossile rémanente.

A travers ces travaux de thèse, il a été montré qu'étudier les écosystèmes terrestres profonds d'un point de vue microbiologique ne devait pas se restreindre à la recherche et à l'analyse de la diversité présente. Au cours des temps géologiques, les formations géologiques profondes ont subi différents événements qui ont fortement affecté le fonctionnement, la structure et la texture des dépôts sédimentaires qui ont, par la suite, impacté sur la microbiologie de ces milieux. Dans cette étude, différentes données relatives à des domaines scientifiques totalement différents (géologie, hydrologie, paléo-thermicité) ont été intégrés afin d'interpréter les résultats acquis en microbiologie. De plus, l'utilisation de traceurs de contamination lors du forage, l'application de méthodes d'échantillonnage adaptées aux études microbiologiques ainsi que l'évaluation d'une potentielle contamination microbienne exogène sont indispensables et constituent les pré-requis aux futures études des communautés microbiennes endogènes menés sur ce type d'écosystème profond.

Effets des paramètres pression, température et salinité sur l'activité métabolique de souches anaérobies

Un comportement différent a été adopté par chaque souche anaérobie de référence choisie pour cette étude face aux effets combinés des paramètres de température, pression et salinité. Néanmoins, parmi elles, toutes les souches originaires d'environnements profonds ont montré des capacités de résistance et d'adaptation spontanées et innées à maintenir leur activité métabolique sous pressions hydrostatiques. Par conséquent, en plus de leur nature halo- et thermo-tolérante, les souches microbiennes étudiées présentaient au minimum un caractère piézo-tolérant en accord avec leur origine endogène des profondeurs. A l'inverse, aucune tendance majeure n'a pu être distinguée pour les microorganismes issus de milieux hypersalés de surface. En effet, alors qu'une souche

(*Methanohalobium evestigatum*) a montré une extrême piézo-sensibilité, ne tolérant aucune pression, l'autre (*Halothermothrix orenii*) a semblé posséder des aptitudes naturelles à la vie sous pression.

Dans les conditions du plan factoriel, une augmentation de pression, de température ou de salinité a eu tendance à diminuer l'activité métabolique de la plupart des souches étudiées confirmant leur nature thermo-tolérante, halophile modérée et piézo-tolérante. De plus, des effets synergiques ont été essentiellement constatés entre les paramètres « Température » et « Pression » et entre les facteurs « Pression » et « Salinité » sur l'activité métabolique procaryotique avec cependant, un effet plus nuancé de l'interaction combinée de ces trois paramètres.

Les métabolismes fermentaires et thiosulfato-réducteurs ont divergé de ces grandes tendances. Selon le plan d'expérience, l'augmentation de la température et de la pression a essentiellement stimulé l'activité de ces souches. En effet, pour les fermentaires, les meilleures activités métaboliques ont été obtenues sous pression (90 et 180 bars) et à température relativement élevée (55°C). Pour les bactéries thiosulfato-réductrices, les activités acquises sous pression appartiennent aux plus fortes activités mesurées au cours de l'étude. L'ensemble de ces souches semble donc particulièrement bien adapté, d'un point de vue métabolique, aux hautes pressions. De plus, les souches thiosulfato-réductrices étudiées ont semblé préférentiellement emprunter la voie fermentaire sous certaines conditions de pression. L'ensemble de ces résultats suggère la fermentation comme le type trophique le plus adapté à la vie sous haute pression donc en profondeur.

Une résistance accrue aux températures élevées sous pression a été mise en évidence pour *Petrotoga mexicana* et *Thermovirga lienii*. Ce phénomène a été expliqué mécaniquement par la plasticité des membranes biologiques mais ce mécanisme reste néanmoins à confirmer pour ces souches. Une variabilité de la résistance à la salinité sous les différentes conditions de température et de pression a également été observée pour chacune des huit souches étudiées. Il se pourrait que différents mécanismes de résistance contre le stress osmotique notamment la nature des solutés compatibles utilisés dans les stratégies « low-salt-in » expliquent les différences de sensibilité à la salinité observées entre les différentes souches au cours de cette étude. D'ailleurs, l'hypothèse quant à la résistance de la bactérie fermentaire *Halothermothrix orenii* aux hautes pressions suggérerait une relation avec sa résistance aux fortes pressions osmotiques.

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives. L'une des perspectives directes de ce travail sera de statuer sur le caractère significatif ou négligeable des différents effets sur l'activité métabolique de

chaque souche afin de mieux appréhender le réel impact des paramètres et de leurs interactions sur les activités. Il serait intéressant d'étudier les effets combinés des paramètres température, pression et salinité sur la composition lipidique et protéique des membranes biologiques, structures cellulaires directement soumises aux modifications du milieu. De par son large spectre de croissance et d'activité révélé dans cette étude, la bactérie thiosulfato-réductrice *Petrotoga mexicana* pourrait être utilisée comme microorganisme modèle pour l'étude de l'influence des paramètres de température, pression et salinité ainsi que de leurs interactions sur sa croissance, son métabolisme et ses mécanismes de résistance dans les conditions imposées par les environnements profonds. Il paraît également important d'étudier les mécanismes de résistance aux stress osmotiques et de leur influence sur la réponse physiologique de souches soumises à de hautes pressions. Les microorganismes possédant la stratégie « low-salt-in » semble particulièrement intéressant. En effet, les solutés compatibles possèdent des propriétés protectrices et stabilisatrices qui pourraient intervenir dans les mécanismes de résistance aux hautes pressions. De plus, une analyse de la viabilité et la cultivabilité des souches après un stress multi-paramètres du type osmotique, thermique et haute pression apparaît comme une piste prometteuse dans la compréhension des systèmes biotiques profonds. Enfin, une étude pourrait être menée sur les effets et les interactions de ces différents types métaboliques sur la biogéochimie du milieu en conditions « profondes » (température et pression élevées, salinité variable). Des expérimentations par percolation de fluide sous pression à travers un échantillon à la porosité connectée pourraient être envisagées afin de mieux appréhender les rôles de tels microorganismes dans l'attaque et/ou la modification de certaines phases minérales en conditions extrêmes.

Références bibliographiques

-A-

- Abe, F., 2007. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: Perspectives from piezophysiology; *Biosci; Biotechnol. Biochem.*, 71(10): 2347-2357.
- Abulencia, C.B., Wyborski, D.L., Garcia, J.A., Podar, M., Chen, W., Chang, S.H., Chang, H.W., Watson, D., Brodie, E.L., Hazen, T.C. and Keller, M., 2006. Environmental Whole-Genome Amplification To Access Microbial Populations in Contaminated Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5): 3291-3301.
- Acinas, S.G., Anton, J. and Rodriguez-Valera, F., 1999. Diversity of Free-Living and Attached Bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as Depicted by Analysis of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(2): 514-522.
- Aggelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M.T., Nannipieri, P. and Pietramellara, G., 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(5): 859-868.
- Aino, K., Hirota, K., Matsuno, T., Morita, N., Nodasaka, Y., Fujiwara, T., Matsuyama, H., Yoshimune, K. and Yumoto, I., 2008. *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1): 120-124.
- Aitken, C.M., Jones, D.M. and Larter, S.R., 2004. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 431: 291-294.
- Al-Rasheedi, S., Kalli, C., Thrasher, D. and Al-Qabandi, S., 1999. Prediction and Evaluation of the Impact of Reservoir Souring in North Kuwait, A Case Study. *Society of Petroleum Engineers*.
- Alain, K., Marteinsson, V.T.r., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D. and Birrien, J.-L., 2002. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4): 1331-9.
- Alain, K. and Querellou, J., 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13(4): 583-594.
- Alazard, D., Magot, M. and Ollivier, B., 2010. Écologie microbienne des réservoirs pétroliers. *Géoscience*, 11: 60-65.
- Almgren, T., Dyrssen, D., Elgquist, B. and Johansson, O., 1976. Dissociation of hydrogen sulphide in seawater and comparison of pH scales. *Marine Chemistry*, 4(3): 289-297.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59(1): 143-169.
- Amend, J.P. and Shock, E.L., 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(2): 175-243.
- Amend, J.P. and Teske, A., 2005. Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 219(1-2): 131-155.
- An, L.Z., Chen, Y., Xiang, S.-R., Shang, T.-C. and Tian, L.-D., 2010. Differences in community composition of bacteria in four glaciers in western China. *Biogeosciences*, 7 : 1937-1952.
- Anderson, R.T., Chapelle, F.H. and Lovley, D.R., 1998. Evidence against hydrogen-based microbial ecosystems in basalt aquifers. *Science*, 281: 976-977.
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F. and Amann, R., 2000. Extremely Halophilic Bacteria in Crystallizer Ponds from Solar Salterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7): 3052-3057.
- Antón, A.I., Martínez-Murcia, A.J. and Rodríguez-Valera, F., 1998. Sequence Diversity in the 16S-23S Intergenic Spacer Region (ISR) of the rRNA Operons in Representatives of the *Escherichia coli* ; ECOR Collection. *Journal of Molecular Evolution*, 47(1): 62-72.
- Arbeli, Z. and Fuentes, C.L., 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiology Letters*, 272(2): 269-275.
- Auguet, J.-C., Barberan, A. and Casamayor, E.O., 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal*, 4: 182-190.

-B-

- Baas Beeking, L.G.M., Kaplan, I.R. and Moore, D.**, 1960. Limits of the environment in term oh pH and oxidation and reduction potentials. *Journal of Geology*, 68: 243-284.
- Bach, W. and Edwards, K.J.**, 2003. Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(20): 3871-3887.
- Baik, K.S., Park, S.C., Kim, E.M., Lim, C.H. and Seong, C.N.**, 2010. *Mucilaginibacter rigui* sp. nov., isolated from wetland freshwater, and emended description of the genus *Mucilaginibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1): 134-139.
- Baker, B.J., Moser, D.P., MacGregor, B.J., Fishbain, S., Wagner, M., Fry, N.K., Jackson, B., Speolstra, N., Loos, S., Takai, K., Lollar, B.S., Fredrickson, J., Balkwill, D., Onstott, T.C., Wimpsee, C.F. and Stahl, D.A.**, 2003a. Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. *Environmental Microbiology*, 5(4): 267-277.
- Baker, G.C., Smith, J.J. and Cowan, D.A.**, 2003b. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3): 541-555.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S.**, 1979. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, 43(2): 260-296.
- Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J. and Parkes, R.J.**, 1997. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the japan sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2): 515-521.
- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K. and Thomas, J.M.**, 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep southeast coastal plain subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(5): 1058-1065.
- Banwart, S., Tullborg, E.-L., Pedersen, K., Gustafsson, E., Laaksoharju, M., Nilsson, A.-C., Wallin, B. and Wikberg, P.**, 1996. Organic carbon oxidation induced by large-scale shallow water intrusion into a vertical fracture zone at the Äspö Hard Rock Laboratory (Sweden). *Journal of Contaminant Hydrology*, 21(1-4): 115-125.
- Banwart, S.A.**, 1999. Reduction of iron(III) minerals by natural organic matter in groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 2919-2928.
- Barbero, J.A., McCurdy, K.G. and Tremaine, P.R.**, 1982. Apparent molal heat capacities and volumes of aqueous hydrogen sulfide and sodium hydrogen sulfide near 25 °C: the temperature dependence of H₂S ionization. *Canadian Journal of Chemistry*, 60(14): 1872-1880.
- Barbieri, E., Potenza, L., Rossi, I., Sisti, D., Giomaro, G., Rossetti, S., Beimfohr, C. and Stocchi, V.**, 2000. phylogenetic characterization and in situ detection of a cytophaga-flexibacter-bacteroides phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11): 5035-5042.
- Barth, T.**, 1991. Organic acids and inorganic ions in waters from petroleum reservoirs, Norwegian continental shelf: a multivariate statistical analysis and comparison with American reservoir formation waters. *Applied Geochemistry*, 6(1): 1-15.
- Bartlett, D.H.**, 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595: 367-381.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Lubbers, B.R. and Pemberton, A.C.**, 2006. DNA extraction from low-biomass carbonate rock: An improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1): 21-31.
- Barton, H.A., Taylor, N.M. and Pace, N.R.**, 2004. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in a oligotrophic cave environment. *Geomicrobiology Journal*, 20: 11-20.
- Basso, O., Lascourreges, J.-F., Le Borgne, F., Le Goff, C. and Magot, M.**, 2009. Characterization by culture and molecular analysis of the microbial diversity of a deep subsurface gas storage aquifer. *Research in Microbiology*, 160(2): 107-116.
- Basso, O., Lascourrèges, J.-F., Jarry, M. and Magot, M.**, 2005. The effect of cleaning and disinfecting the sampling well on the microbial communities of deep subsurface water samples. *Environmental Microbiology*, 7(1): 13-21.
- Bastias, M. and Gentina, J.C.**, 2010. Variables affecting the growth and ferrous oxidation capacity of *L. ferrooxidans* in continuous culture *Hydrometallurgy* 104: 351-355.
- Bastin, E.S.**, 1926. The problem of the natural reduction of sulphates. *AAPG Bulletin*, 10(12): 1270-1299.

- Bernard, F.P., Connan, J. and Magot, M.**, 1992. Indigenous microorganisms in connate water of many oil fields: a new tool in exploration and production techniques. In: *Proceedings of the Society of petroleum Engineers*. Society of petroleum Engineers, Richardson, TX, pp. 467-475.
- Bernhardt, G., Jaenicke, R., Ludemann, H.-D., König, H. and Stetter, K.O.**, 1988. High Pressure Enhances the Growth Rate of the Thermophilic Archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus* without Extending Its Temperature Range. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5): 1258-1261.
- Bertrand, H., Poly, F., Van, V.T., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T.M. and Simonet, P.**, 2005. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods*, 62(1): 1-11.
- Biddle, J.F., House, C.H. and Brenchley, J.E.**, 2005. Enrichment and cultivation of microorganisms from sediment from the slope of the peru trench (ODP site 1230). In: *Proc. ODP, Sci. Results*, 201.
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J., Schrag, D.P., Sogin, M.L., Brenchley, J.E., Teske, A., House, C.H. and Hinrichs, K.-U.**, 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10): 3846-3851.
- Binga, E.K., Lasken, R.S. and Neufeld, J.D.**, 2008. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME Journal*, 2: 233-241.
- Birkeland, N.-K.**, 2005. Sulfate reducing bacteria and archaea, In: *Petroleum Microbiology*. ASM, Washington, DC, pp. 35-54.
- Blothe, M., Akob, D.M., Kostka, J.E., Goschel, K., Drake, H.L. and Kusel, K.**, 2008. pH gradient-induced heterogeneity of Fe(III)-reducing microorganisms in coal mining-associated lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(4): 1019-1029.
- Böckelmann, U., Szewzyk, U. and Grohmann, E.**, 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1): 201-211.
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Dumas, S. and Christen, R.**, 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9): 3405-3412.
- Borneman, J. and Triplett, E.**, 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(7): 2647-2653.
- Bourquin, S., Peron, S. and Durand, M.**, 2006. Lower Triassic sequence stratigraphy of the western part of the Germanic Basin (west of Black Forest): Fluvial system evolution through time and space. *Sedimentary Geology*, 186(3-4): 187-211.
- Brazelton, W.J., Schrenk, M.O., Kelley, D.S. and Baross, J.A.**, 2006. Methane- and sulfur-metabolizing microbial communities dominate the Lost City Hydrothermal Field ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9): 6257-6270.
- Brock, T.D.**, 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag (New York).
- Brock, T.D. and Freeze, H.**, 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J. Bacteriol.*, 98(1): 289-297.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H.F.**, 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148(2): 107-127.
- Brown, A.D.**, 1976. Microbial ater stress. *Bacteriol. Rev.*, 40: 803-846.
- Bruce, K.**, 1997. Analysis of *mer* Gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(12): 4914-4919.
- Brunet, M.-F. and Le Pichon, X.**, 1982. Subsidence of the Paris Basin. *J. Geophys. Res.*, 87(B10): 8547-8560.
- Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D. and Godfroy, A.**, 2009. Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles*, 13(4): 595-608.

-C-

- Carrigg, C., Rice, O., Kavanagh, S., Collins, G. and O'Flaherty, V.**, 2007. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4): 955-964.
- Cavelier, C., Mégnien, C., Pomero, I.C. and Rat, P.**, 1979. Le Bassin de Paris. *Bull. Inf. Geol. Bassin de Paris*, 16(4): 1-52.

- Cayol, J.-L., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Prensier, G., Guezennec, J. and Garcia, J.-L., 1994. Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a Halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 534-540.
- Celle-Jeanton, H., Huneau, F., Travi, Y. and Edmunds, W.M., 2009. Twenty years of groundwater evolution in the Triassic sandstone aquifer of Lorraine: Impacts on baseline water quality. *Applied Geochemistry*, 24(7): 1198-1213.
- Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudaury, T. and Godon, J.J., 2004. 16S rDNA characterization of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 93: 227-232.
- Chandler, D.P., Brockman, F.J. and Fredrickson, J.K., 1997. Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 217-230.
- Chapelle, F.H., 1993. Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Chapelle, F.H. and Bradley, P.M., 1996. Microbial acetogenesis as a source of organic acids in ancient Atlantic Coastal Plain sediments. *Geology*, 24(10): 925-928.
- Chapelle, F.H. and Lovley, D.R., 1990. Rates of Microbial Metabolism in Deep Coastal Plain Aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6): 1865-1874.
- Chapelle, F.H., O'Neill, K., Bradley, P.M., Methe, B.A., Ciufo, S.A., Knobel, L.L. and Lovley, D.R., 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature*, 415: 312-315.
- Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. and Vandamme, P., 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5): 1729-35.
- Christner, B.C., Royston-Bishop, G., Foreman, C.M., Arnold, B.R., Tranter, M., Welch, K.A., Lyons, W.B., Tsapin, A.I., Studinger, M. and Priscu, J.C., 2006. Limnological conditions in subglacial lake Vostok, Antarctica. *Limnology and Oceanography*, 51(6): 2485-2501.
- Chuvochina, M., Alekhina, I., Normand, P., Petit, J. and Bulat, S., 2011. Three events of Saharan dust deposition on the Mont Blanc glacier associated with different snow-colonizing bacterial phylotypes. *Microbiology*, 80(1): 25-131.
- Colwell, F.S., Onstott, T.C., Delwiche, M.E., Chandler, D., Fredrickson, J.K., Yao, Q.-J., McKinley, J.P., Boone, D.R., Griffiths, R., Phelps, T.J., Ringelberg, D., White, D.C., LaFreniere, L., Balkwill, D., Lehman, R.M., Konisky, J. and Long, P.E., 1997. Microorganisms from deep, high temperature sandstones: constraints on microbial colonization. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 425-435.
- Colwell, R.K., Mao, C.X. and Chang, J., 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, 85(10): 2717-2727.
- Connon, S.A., Lester, E.D., Shafaat, H.S., Obenhuber, D.C. and Ponce, A., 2007. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research*, 112: G04S17.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.*, 176(8): 2137-2142.
- Cowen, J.P., Giovannoni, S.J., Kenig, F., Johnson, H.P., Butterfield, D., Rappe, M.S., Hutnak, M. and Lam, P., 2003. Fluids from aging ocean crust that support microbial life. *Science*, 299: 120-123.
- Cragg, B.A., Parkes, R.J., Fry, J.C., Herbert, R.A., Wimpenny, J.W.T. and Getliff, J.M., 1990. Bacterial biomass and activity profiles within deep sediment layers. In: *Proc. Ocean Drill. Program: Sci. Results* 112, 607-619.
- Cragg, B.A., Summit, M. and Parkes, R.J., 2000. Bacterial profiles in a sulfide mound (site 1035) and an area of active fluid venting in hot hydrothermal sediment from Middle Valley (north-east Pacific). In: *Proc Ocean Drilling Program Sci Results*, 169.

-D-

- D'Hondt, S., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B.A., Cypionka, H., Dickens, G.R., Ferdelman, T., Hinrichs, K.-U., Holm, N.G., Mitterer, R., Spivack, A., Wang, G., Bekins, B., Engelen, B., Ford, K., Gettemy, G., Rutherford, S.D., Sass, H., Skilbeck, C.G., Aiello, I.W., Guérin, G., House, C.H., Inagaki, F., Meister, P., Naehr, T., Niitsuma, S., Parkes, R.J., Schippers, A., Smith, D.C., Teske, A., Wiegel, J., Padilla, C.N. and Acosta, J.L.S., 2004. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science*, 306(5705): 2216-2221.

- D'Hondt, S.L., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., et al., 2003. *Proc. ODP, Init. Repts.*, 201. Disponible par : ODP, Texas A&M University, College Station TX 77845-9547, USA.
- Da Cunha, C., Rosado, A., Sebastián, G., Seldin, L. and von der Weid, I., 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4): 949-959.
- Dahle, H. and Birkeland, N.-K., 2006. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7): 1539-1545.
- Damsté, J.S.S. and Coolen, M.J.L., 2006. Fossil DNA in cretaceous black shales: myth or reality? *Astrobiology*, 6(2): 299-302.
- Dang, P.N., Dang, T.C.H., Lai, T.H. and Stan-Lotter, H., 1996. *Desulfovibrio vietnamensis* sp. nov., a Halophilic Sulfate-Reducing Bacterium from Vietnamese Oil Fields. *Anaerobe*, 2(6): 385-392.
- Danovaro, R., Luna, G.M., Dell'Anno, A. and Pietrangeli, B., 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9): 5982-5989.
- Daumas, S., Cord-Ruwisch, R. and Garcia, J.L., 1988. *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54(2): 165-178.
- Davis, E.E., Chapman, D.S., Wang, K., Viillinger, H., Fisher, A.T., Robinson, S.W., Grigel, J., Pribnow, D., Stein, J. and Becke, K., 1999. Regional heat flow variations across the sedimented Juan de Fuca Ridge eastern flank: Constraints on lithospheric cooling and lateral hydrothermal heat transport. *Journal of Geophysical Research*, 104(B8): 17675-17688.
- De Marco, P., Pacheco, C.C., Figueiredo, A.R.M. and oradas-Ferreira, P., 2004. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1): 75-80.
- De Wever, P., Guillocheau, F., Reynaud, J.-Y., Vennin, E., Robin, C., Cornée, A. and Rouby, D., 2002. Deux siècles de stratigraphie dans le bassin de Paris Two centuries of stratigraphy in the Paris Basin. *Comptes Rendus Palevol*, 1(6): 399-414.
- Delbès, C., Godon, J.-J. and Moletta, R., 1998. 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe*, 4(6): 267-275.
- DeLong, E.F., 2004. Microbial Life Breathes Deep. *Science*, 306(5705): 2198-2200.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P. and Ranjard, L., 2011. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20(4): 641-652.
- Detmers, J., Schulte, U., Strauss, H. and Kuever, J., 2001. Sulfate Reduction at a Lignite Seam: Microbial Abundance and Activity. *Microbial Ecology*, 42(3): 238-247.
- Dickson, A.G., 1984. pH scales and proton-transfer reactions in saline media such as sea water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(11): 2299-2308.
- Dombrowski, H.J., 1966. Geological problems in the question of living bacteria in Paleozoic salt deposits. In: *Northern Ohio Geological Society, Second Symposium on Salt*, Cleveland, Ohio, pp. 215-219.
- Dorigo, U., Volatier, L. and Humbert, J.-F., 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39(11): 2207-2218.
- Duan, Z., Sun, R., Liu, R. and Zhu, C., 2007. Accurate thermodynamic model for the calculation of H₂S solubility in pure water and brines. *Energy & Fuels*, 21(4): 2056-2065.
- Duan, Z.H. and Mao, S.D., 2006. A thermodynamic model for calculating methane solubility, density and gas phase composition of methane-bearing aqueous fluids from 273 to 523 K and from 1 to 2000 bar. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(13): 3369-3386.

-E-

- Eder, W., Wanner, G., Ludwig, W., Busse, H.J., Ziemke-Kageler, F. and Lang, E., 2011. Description of *Undibacterium oligocarboniphilum* sp. nov., isolated from purified water, and *Undibacterium pigrum* strain CCUG 49012 as the type strain of *Undibacterium parvum* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Undibacterium* and the species *Undibacterium pigrum*. *International Journal Systematic and Evolutionary of Microbiology*, 61: 384-391.

- Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A., de Vera Gomez, A. and Sogin, M.L., 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11): 7658-7662.
- Edwards, K.J., Bach, W. and McCollom, T.M., 2005. Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology*, 13(9): 449-456.
- Egert, M. and Friedrich, M.W., 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a pcr-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2555-2562.
- Elhottová, D., Křišťůfek, V., Frouz, J., Nováková, A. and Chroňáková, A., 2006. Screening for microbial markers in Miocene sediment exposed during open-cast brown coal mining. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3): 459-463.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J. and Fry, J.C., 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6): 3223-3230.
- Eloe, E.A., Shulse, C.N., Fadrosch, D.W., Williamson, S.J., Allen, E.E. and Bartlett, D.H., 2011. Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environmental Microbiology Reports*, 3(4): 449-458.
- Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Roe, B.A., Davis, J.P., Schloss, P.D., Bailey, V.L. and Krumholz, L.R., 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(17): 5422-5428.
- Engebretson, J.J. and Moyer, C.L., 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(8): 4823-4829.
- Erauso G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B. Partensky, F., Baross, B.A., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N.R. and Prieur, D., 1993. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 16(5) : 338-349
- Ericsson, L.O., 1999. Geoscientific R&D for high level radioactive waste disposal in Sweden - current status and future plans. *Engineering Geology*, 52(3-4): 305-317.

-F-

- Fajardo-Cavazos, P. and Nicholson, W., 2006. *Bacillus* endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed *Bacillus* spp. from endolithic and extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4): 2856-2863.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fish, S.A., Shepherd, T.J., McGenity, T.J. and Grant, W.D., 2002. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. *Nature*, 417: 432-436.
- Fisher, J.B., 1987. Distribution and occurrence of aliphatic acid anions in deep subsurface waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(9): 2459-2468.
- Fontes, J.C. and Matray, J.M., 1993a. Geochemistry and origin of formation brines from the Paris Basin, France: 1. Brines associated with Triassic salts. *Chemical Geology*, 109(1-4): 149-175.
- Fontes, J.C. and Matray, J.M., 1993b. Geochemistry and origin of formation brines from the Paris Basin, France: 2. Saline solutions associated with oil fields. *Chemical Geology*, 109(1-4): 177-200.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P., 1992. How Close Is Close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1): 166-170.
- Francis, A.J., Slater, J.M. and Dodge, C.J., 1989. Denitrification in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journal*, 7: 103-116.
- Fredrickson, J.K. and Balkwill, D.L., 2006. Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal*, 23(6): 345 - 356.
- Fredrickson, J.K., Garland, T.R., Hicks, R.J., Thomas, J.M. and Li, S.W., 1989. Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiology Journal*, 7(1/2): 53-66.
- Fredrickson, J.K., McKinley, J.P., Bjornstad, B.N., Long, P.E., Ringelberg, D.B., White, D.C., Krumholz, L.R., Suflita, J.M., Colwell, F.S., Lehman, R.M., Phelps, T.J. and Onstott, T.C., 1997. Pore-size constraints on the activity and survival of subsurface bacteria in a late cretaceous shale-sandstone sequence, northwestern New Mexico. *Geomicrobiology Journal*, 14(3): 183-202.
- Fredrickson, J.K. and Onstott, T.C., 1996. Microbes deep inside the earth. *Scientific American*, 275(4): 68-73.

- Fredrickson, J.K. and Onstott, T.C., 2001. Biogeochemical and geological significance of subsurface microbiology. In: *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry*, New York, pp. 3-37.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.-m.W., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F. and Brockman, F.J., 2004. Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site, Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7): 4230-4241.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. and Simonet, P., 1999. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5409-5420.
- Fry, J., Horsfield, B., Sykes, R., Cragg, B., Heywood, C., Kim, G.T., Mangelsdorf, K., Mildenhall, D., Rinna, J., Vieth, A., Zink, K.-G., Sass, H., Weightman, A. and Parkes, R.J., 2009. Prokaryotic Populations and Activities in an Interbedded Coal Deposit, Including a Previously Deeply Buried Section (1.6-2.3 km) Above ~ 150 Ma Basement Rock. *Geomicrobiology Journal*, 26(3): 163-178.
- Fry, J.C., Parkes, R.J., Cragg, B.A. and Weightman, A.J.W., Webster, G., 2008. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(2): 18-196.
- Fry, J.C., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J. and Parkes, R.J., 2006. Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(1): 86-98.
- Fry, N., Fredrickson, J., Fishbain, S., Wagner, M. and Stahl, D., 1997. Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4): 1498-1504.

-G-

- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C. and Stotzky, G., 1994. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 15(1-2): 119-126.
- Garcia-Martinez, J., Acinas, S.G., Anton, A.I. and Rodriguez-Valera, F., 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 55-64.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. and Vanbroekhoven, K., 2006. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2): 194-205.
- Gérard, E., Moreira, D., Philippot, P., Van Kranendonk, M.J. and López-García, P., 2009. Modern subsurface bacteria in pristine 2.7 Ga-Old fossil stromatolite drillcore samples from the Fortescue Group, Western Australia. *PLoS ONE*, 4(4): e5298.
- Ghiorse, W.C. and Wilson, J.T., 1988. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. In: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 107-172.
- Gich, F.B., Amer, E., Figueras, J.B., Abella, C.A., Balaguer, M.D. and Poch, M., 2000. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *International Microbiology*, 3(2): 103-106.
- Gil, M., 1989. Equilibres chimiques dans les eaux naturelles. *Sciences et Techniques*.
- Gillooly, J.F., Allen, A.P., West, G.B. and Brown, J.H., 2005. The rate of DNA evolution: Effects of body size and temperature on the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1): 140-145.
- Glaeser, S.P., Grossart, H.-P. and Glaeser, J., 2010. Singlet oxygen, a neglected but important environmental factor: short-term and long-term effects on bacterioplankton composition in a humic lake. *Environmental Microbiology*, 12(12): 3124-3136.
- Glockner, F.O., Fuchs, B.M. and Amann, R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8): 3721-3726.
- Goldscheider, N., Hunkeler, D. and Rossi, P., 2006. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, 14(6): 926-941.
- Gomila, M., Bowien, B., Falsen, E., Moore, E.R.B. and Lalucat, J., 2007. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11): 2629-2635.

- Gonzalez, J.M., Portillo, M.C. and Saiz-Jimenez, C.,** 2005. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environmental Microbiology*, 7(7): 1024-1028.
- Good, I.J.,** 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40(3-4): 237-264.
- Gorlenko, V., Tsapin, A., Namsaraev, Z., Teal, T., Tourova, T., Engler, D., Mielke, R. and Neilson, K.,** 2004. *Anaerobranca californiensis* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic, fermentative bacterium isolated from a hot spring on Mono Lake. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 739-743.
- Grant, W.D.,** 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1448): 1249-1267.
- Grant, W.D., Gemmell, R.T. and McGenity, T.J.,** 1998. Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles*, 2(3): 279-287.
- Grassia, G.S., McLean, K.M., Glénat, P., Bauld, J. and Sheehy, A.J.,** 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology*, 21(1): 47-58.
- Green, C.T. and Scow, K.M.,** 2000. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal*, 8(1): 126-141.
- Grey, B.E. and Steck, T.R.,** 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9): 3866-3872.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H. and Liesack, W.,** 1998. Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(3): 960-969.
- Guerrero, R.,** 1998. Crucial crisis in biology: life in the deep biosphere. *International Microbiology*, 1: 285-294.

-H-

- Haight, R.D. and Morita, R.Y.,** 1962. Interaction between the parameters of hydrostatic pressure and temperature on aspartase of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 83(1): 112-120.
- Hall, T.,** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hallbeck, L. and Pedersen, K.,** 2008. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Applied Geochemistry*, 23(7): 1796-1819.
- Harayama, S., Kasai, Y. and Hara, A.,** 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3): 205-214.
- Hashim, S.O., Delgado, O., Hatti-Kaul, R., Mulaa, F.J. and Mattiasson, B.,** 2004. Starch hydrolysing *Bacillus halodurans* isolates from a Kenyan soda lake. *Biotechnology Letters*, 26(10): 823-828.
- Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y. and Nakamura, A.,** 2005. *Planifilum fimeticola* gen. nov., sp. nov. and *Planifilum fulgidum* sp. nov., novel members of the family 'Thermoactinomycetaceae' isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5): 2101-2104.
- Haveman, S.A., Pedersen, K. and Ruotsalainen, P.,** 1999. Distribution and Metabolic Diversity of Microorganisms in Deep Igneous Rock Aquifers of Finland. *Geomicrobiology Journal*, 16(4): 277-294.
- Hazen, T., Jiménez, L., López de Victoria, G. and Fliermans, C.,** 1991. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microbial Ecology*, 22(1): 293-304.
- Hebenbrock, K., Williams, P.M. and Karger, B.L.,** 1995. Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection. *ELECTROPHORESIS*, 16(1): 1429-1436.
- Herrera, A. and Cockell, C.S.,** 2007. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1): 1-12.
- Hobel, C.F.V.,** 2004. Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. *Thesis*, Faculty of Sciences, Reykjavik, Iceland.
- Hoehler, T.M.,** 2005. Cretaceous Park? A commentary on microbial paleomics. *Astrobiology*, 5(2): 95-99.
- Holm, N.G.,** 1992. Marine hydrothermal systems and the origin of life-special issue. *Origins Life Evol. Biosphere.*, 22: 1-242.

- Hong, H., Pruden, A. and Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1): 52-64.
- Horikoshi, K., 1998. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Current Opinion in Microbiology*, 1(3): 291-295.
- House, C.H., Cragg, B.A., Teske, A. and al., 2003. Drilling contamination tests during ODP Leg 201 using chemical and particulate tracers. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports Vol 201*
- Huber, H., Thomm, M., König, H., Thies, G. and Stetter, K.O., 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Archives of Microbiology*, 132(1): 47-50.
- Huber, J.A., Butterfield, D.A. and Baross, J.A., 2002. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(4): 1585-1594.
- Huber, J.A., Johnson, H.P., Butterfield, D.A. and Baross, J.A., 2006. Microbial life in ridge flank crustal fluids. *Environmental Microbiology*, 8(1): 88-99.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. and Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, 180(18): 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Hooper, S.D. and Kyrpides, N.C., 2009. Focus: Synergistetes. *Environmental Microbiology*, 11(6): 1327-1329.

-I/J-

- Ikeda, S., Tsurumaru, H., Wakai, S., Noritake, C., Fujishiro, K., Akasaka, M. and Ando, K., 2008. Evaluation of the effects of different additives in improving the DNA extraction yield and quality from andosol. *Microbes and Environments*, 23(2): 159-166.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'Hondt, S. and Jørgensen, B.B., 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8): 2815-2820.
- Inagaki, F., Okada, H., Tsapin, A.I. and Nealson, K.H., 2005. Microbial survival: The Paleome: A sedimentary genetic record of past microbial communities. *Astrobiology*, 5(2): 141-153.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Inoue, A., Kato, C. and Horikoshi, K., 2002. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 4(5): 277-286.
- Inagaki, F., Takai, K., Komatsu, T., Kanamatsu, T., Fujioka, K. and Horikoshi, K., 2001. Archaeology of Archaea: geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea seafloor environment. *Extremophiles*, 5(6): 385-392.
- Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K., Nunoura, T., Nealson, K.H. and Horikoshi, K., 2004. Characterization of C₁-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, Southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxrA*, *mcrA*, and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12): 7445-7455.
- IPCC, 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: P. Core Writing Team, R.K and Reisinger, A. (Editor). IPCC, Geneva.
- Jain, D.K., Stroes-Gascoyne, S., Providenti, M., Tanner, C. and Cord, I., 1997. Characterization of microbial communities in deep groundwater from granitic rock. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(3): 272-283.
- Jannasch, H.W. and Mottl, M.J., 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, 229(4715): 717-725.
- Jaenicke, R., Bernhardt, G., Lüdemann, H.-D. and Stetter, K.O., 1988. Pressure-induced alterations in the protein pattern of the thermophilic archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(10): 2375-2380.
- Jaenicke, R. and Zavodszky, P., 1990. Proteins under extreme physical conditions. *FEBS*, 268(2): 344-349.
- Jeanthon, C., Nercissian, O., Corre, E. and Grabowski-Lux, A., 2005. Hyperthermophilic and methanogenic archaea in oil fields. In: *Petroleum microbiology*. ASM, Washington, DC.
- Jenneman, G.E., McInerney, M.J. and Knapp, R.M., 1985. microbial penetration through nutrient-saturated Berea Sandstone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(2): 383-391.

- Johnson, R.M., Schwent, R.M. and Press, W., 1968. The characteristics and distribution of marine bacteria isolated from the Indian Ocean. *Limnology and Oceanography*, 13(4): 656-664.
- Jones, D.M., Head, I.M., Gray, N.D., Adams, J.J., Rowan, A.K., Aitken, C.M., Bennett, B., Huang, H., Brown, A., Bowler, B.F.J., Oldenburg, T., Erdmann, M. and Larter, S.R., 2008. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 451(7175): 176-180.
- Jones, R.E., Beeman, R.E. and Suflita, J.M., 1989. Anaerobic metabolic processes in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal*, 7(1/2): 17-130.
- Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A. and Janssen, P.H., 2003. Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7210-7215.
- Joye, S.B., Samarkin, V.A., Orcutt, B.N., MacDonald, I.R., Hinrichs, K.-U., Elvert, M., Teske, A.P., Lloyd, K.G., Lever, M.A., Montoya, J.P. and Meile, C.D., 2009. Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nature Geosci*, 2(5): 349-354.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, pp. 21-132.

-K-

- Kaeberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S.S., 2002. Isolating "Uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570): 1127-1129.
- Kallmeyer, J. and Boetius, A., 2004. Effects of temperature and pressure on sulfate reduction and anaerobic oxidation of methane in hydrothermal sediments of Guaymas Basin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2): 1231-1233.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. and Szewzyk, U., 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2): 769-777.
- Kämpfer, P., Rosselló-Mora, R., Hermansson, M., Persson, F., Huber, B., Falsen, E. and Busse, H.-J., 2007. *Undibacterium pigrum* gen. nov., sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7): 1510-1515.
- Karl, D.M., Taylor, G.T., Novitsky, J.A., Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., Pace, N.R., Lane, D.J., Olsen, G.J. and Giovannoni, S.J., 1988. A microbiological study of Guaymas Basin high temperature hydrothermal vents. Deep Sea Research Part A. *Oceanographic Research Papers*, 35(5): 777-791.
- Kashefi, K. and Lovley, D.R., 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301(5635): 934.
- Katz, A.J. and Thompson, A.H., 1986. Quantitative prediction of permeability in porous rock. *Physical review, Series B*, 34: 8179-8191.
- Kaye, J.Z. and Baross, J.A., 2004. Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure, and salinity on growth, phospholipid profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(10): 6220-6229.
- Kaye, J.Z., Márquez, M.C., Ventosa, A. and Baross, J.A., 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2): 499-511.
- Kimura, H., Sugihara, M., Yamamoto, H., Patel, B., Kato, K. and Hanada, S., 2005. Microbial community in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the Great Artesian Basin, Australia. *Extremophiles*, 9(1): 407-414.
- Kjeldsen, K.U., Obst, M., Nakano, H., Funch, P. and Schramm, A., 2010. Two types of endosymbiotic bacteria in the enigmatic marine worm *Xenoturbella*. *Appl. Environ. Microbiol.*: AEM.01092-09.
- Klauth, P., Wilhelm, R., Klumpp, E., Poschen, L. and Groeneweg, J., 2004. Enumeration of soil bacteria with the green fluorescent nucleic acid dye Sytox green in the presence of soil particles. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2): 189-198.
- Kobayashi, T., Koide, O., Mori, K., Shimamura, S., Matsuura, T., Miura, T., Takaki, Y., Morono, Y., Nunoura, T., Imachi, H., Inagaki, F., Takai, K. and Horikoshi, K., 2008. Phylogenetic and enzymatic diversity of deep seafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles*, 12(4): 519-527.

- Kotelnikova, S.**, 2002. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Reviews*, 58(3-4): 367-395.
- Kotelnikova, S. and Pedersen, K.**, 1997. Evidence for methanogenic Archaea and homoacetogenic Bacteria in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 339-349.
- Kotelnikova, S. and Pedersen, K.**, 1998. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(2): 121-134.
- Kovacik, W.P., Takai, K., Mormile, M.R., McKinley, J.P., Brockman, F.J., Fredrickson, J.K. and Holben, W.E.**, 2006. Molecular analysis of deep subsurface Cretaceous rock indicates abundant Fe(III)- and S⁰-reducing bacteria in a sulfate-rich environment. *Environmental Microbiology*, 8(1): 141-155.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, Jr., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W.**, 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4): 1489-1497.
- Krumholz, L.R.**, 2000. Microbial communities in the deep subsurface. *Hydrogeology Journal*, 8(1): 4-10.
- Krumholz, L.R., Harris, S.H., Tay, S.T. and Suflita, J.M.**, 1999. Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(6): 2300-2306.
- Krumholz, L.R., McKinley, J.P., Ulrich, G.A. and Suflita, J.M.**, 1997. Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock. *Nature*, 386(6620): 64-66.
- Kuznetsov, S.I., Ivanov, M.V. and Lyalikova, N.N.**, 1963. Introduction to geological microbiology. McGraw-Hill, New York.

-L-

- L'Haridon, S., Reysenbacht, A.L., Glenat, P., Prieur, D. and Jeanthon, C.**, 1995. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature*, 377(6546): 223-224.
- La Duc, M.T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D. and Venkateswaran, K.**, 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean-room environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(8): 2600-2611
- Lan, R. and Reeves, P.R.**, 1998. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 144(5): 1213-1221.
- Landrein, P., Vigneron, G., Delay, J., Lebon, P. and Pagel, M.**, 2010. Évaluation des transferts et de la température dans un système sédimentaire multi-couches mésozoïque du bassin de Paris: les apports des forages Andra de la plate-forme de Montiers-sur-Saulx (Meuse). *Rapport de synthèse*.
- Lane, D.J.**, 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Editors). Wiley Press, Chichester, pp. 130-141.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R.**, 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20): 6955-6959.
- La Rosa, G., De Carolis, E., Sali, M., Papacchini, M., Riccardi, C., Mansi, A., Paba, E., Alquati, C., Bestetti, G. and Muscillo, M.**, 2006. Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Microbiological Research*, 161(2): 150-157.
- Larsen, H.**, 1981. The family *Halobacteriaceae*. In: *The procaryotes. A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria*, S.H. Starr MP, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (Editor). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 985-994.
- Lau, M., Aitchison, J. and Pointing, S.**, 2009. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*, 13(1): 139-149.
- Lear, G. and Lewis, G.D.**, 2009. Impact of catchment land use on bacterial communities within stream biofilms. *Ecological Indicators*, 9(5): 848-855.
- Lee, D., Zo, Y. and Kim, S.**, 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9): 3112-3120.
- Lehman, R.M., Colwell, F.S., Ringelberg, D.B. and White, D.C.**, 1995. Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *Journal of Microbiological Methods*, 22(3): 263-281.

- Lerner, A., Shor, Y., Vinokurov, A., Okon, Y. and Jurkevitch, E., 2006. Can denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of amplified 16s rDNA of soil bacterial populations be used in forensic investigations? *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6): 1188-1192.
- Li, H., Yang, S.-Z., Mu, B.-Z., Rong, Z.-F. and Zhang, J., 2007. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oilfield. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(1): 74-84.
- Li, Z., Zou, C., He, Y., Mo, M. and Zhang, K., 2008. Phylogenetic analysis on the bacteria producing non-volatile fungistatic substances. *The Journal of Microbiology*, 46(3): 250-256.
- Lin, L.-H., Wang, P.-L., Rumble, D., Lippmann-Pipke, J., Boice, E., Pratt, L.M., Lollar, B.S., Brodie, E.L., Hazen, T.C., Andersen, G.L., DeSantis, T.Z., Moser, D.P., Kershaw, D. and Onstott, T.C., 2006. Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome. *Science*, 314(5798): 479-482.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715.
- Lindquist, D., Murrill, D., Burran, W.P., Winans, G., Janda, J.M. and Probert, W., 2003. Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-like isolates from human patients, with an emended description of the species. *J. Clin. Microbiol.*, 41(1): 192-196.
- Liu, W., Marsh, T., Cheng, H. and Forney, L., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11): 4516-4522.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.-P. and Godon, J.-J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8(4): 720-731.
- López-García, P. and Moreira, D., 2008. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology*, 159(1): 67-73.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W., 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl Environ Microbiol*, 53(12): 2948-2952.
- Love, C.A., Patel, B.K.C., Nichols, P.D. and Stackebrandt, E., 1993. *Desulfotomaculum australicum*, sp. nov.: A thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(2): 244-251.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Philips, E.J.P. and Woodward, J.C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382: 445-448.
- Luna, G.M., Dell'Anno, A. and Danovaro, R., 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8(2): 308-320.
- Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W. and Simon, M., 2005. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environmental Microbiology*, 7(7): 961-968.
- Luz, S.P., Rodriguez-Valera, F., Lan, R. and Reeves, P.R., 1998. Variation of the Ribosomal Operon 16S-23S Gene Spacer Region in Representatives of *Salmonella enterica* Subspecies. *J. Bacteriol.*, 180(8): 2144-2151.
- Lysnes, K., Thorseth, I.H., Steinsbu, B.O., Øvreås, L., Torsvik, T. and Pedersen, R.B., 2004. Microbial community diversity in seafloor basalt from the Arctic spreading ridges. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(3): 213-230.

-M-

- Madon, M., 1992. Mantle. *Encyclopedia of Earth system science*, 3. Academic press, San Diego.
- Madsen, E.L., 2000. Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms. *Hydrogeology Journal*, 8(1): 112-125.
- Magot, M., 2005. Indigenous microbial communities in oil fields. In: B. *Petroleum microbiology*. ASM, Washington, DC.
- Magot, M., Basso, O., Tardy-Jacquenod, C. and Caumette, P., 2004. *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1693-1697.
- Magot, M., Ollivier, B. and Patel, B.K.C., 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77(2): 103-116.

- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. and Naidu, R., 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34(2): 265-276.
- Marchesi, J.R., Weightman, A.J., Cragg, B.A., John Parkes, R. and Fry, J.C., 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3): 221-228.
- Marschner, P., 2007. Soil microbial community structure and function assessed by FAME, PLFA and DGGE — Advantages and Limitations. In: *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. Soil Biology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 181-200.
- Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3): 323-327.
- Martinsson, V., Moulin, P., Birrien, J., Gambacorta, A., Vernet, M. and Prieur, D., 1997. Physiological responses to stress conditions and barophilic behavior of the hyperthermophilic vent archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4): 1230-1236.
- Martinsson, V.T., Birrien, J.-L., Reysenbach, A.-L., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A., Messner, P., Sleytr, U.B. and Prieur, D., 1999. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2): 351-359.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G. and Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5): 2354-2359.
- Martini, A.M., Budai, J.M., Walter, L.M. and Schoell, M., 1996. Microbial generation of economic accumulations of methane within a shallow organic-rich shale. *Nature*, 383(6596): 155-158.
- Marty, B., Dewonck, S. and France-Lanord, C., 2003. Geochemical evidence for efficient aquifer isolation over geological timeframes. *Nature*, 425(55-58).
- Mason, O.U., Di Meo-Savoie, C.A., Nostrand, J.D., Zhou, V.J., Fisk, M.R. and Giovannoni, S.J., 2009. Prokaryotic diversity, distribution, and insights into their role in biogeochemical cycling in marine basalts. *ISME Journal*, 3: 231-242.
- Matray, J.M., Meunier, A., Thomas, M. and Fontes, J.C., 1989. Les eaux de formation du Trias et du Dogger du Bassin Parisien: histoire et effets diagénétiques sur les réservoirs. *Bull. Cent. Rech. Explor.*, 13: 484-504.
- Mauclaire, L., McKenzie, J.A., Schwyn, B. and Bossart, P., 2007. Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 32(1-7): 232-240.
- McGenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, W.D. and Stan-Lotter, H., 2000. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 2(3): 243-250.
- McInerney, M.J., Nagle, D.P. and Knapp, R.M., 2005. Microbially enhanced oil recovery: past, present and future. In: *Petroleum microbiology*. ASM, Washington, DC, pp. 215-238.
- McMahon, P.B., 2001. Aquifer/aquitard interfaces: mixing zones that enhance biogeochemical reactions. *Hydrogeology Journal*, 9(1): 34-43.
- McMahon, P.B., Böhlke, J.K. and Bruce, B.W., 1999. Denitrification in marine shales in northeastern Colorado. *Water Resour. Res.*, 35(5): 1629-1642.
- McMahon, P.B. and Chapelle, F.H., 1991. Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature*, 349(6306): 233-235.
- Ménez, B., Dupraz, S., Gérard, E., Guyot, F., Rommevaux-Jestin, C., Libert, M., Jullien, M., Michel, C., Delorme, F., Battaglia-Brunet, F., Ignatiadis, I., Garcia, B., Blanchet, D., Huc, A.-Y., Haeseler, F., Oger, P., Dromart, G., Ollivier, B. and Magot, M., 2007. Impact of the deep biosphere on CO₂ storage performance. *Geotechnologies Science Report*, 9: 150-163.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaëys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. and Wattiez, R., 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3): 385-410.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L. and Ghiorse, W.C., 1999. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11): 4715-4724.
- Millero, F.J., 1982. Use of models to determine ionic interactions in natural waters. *Thalassia Jugoslavica*, 18: 253-291.

- Millero, F.J., 1986. The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Marine Chemistry*, 18(2-4): 121-147.
- Minoux, G., 1967. Observations complémentaires sur la couverture triasique et son substratum dans l'arégion occidentale des Vosges. Nouveaux forages dans les bassins de Vittel, Contrexéville et Martigny-les-Bains, 9. *Bulletin de la Société géologique de France*, Paris, 679-690 pp.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J.-L., Garcia, J.-L. and Ollivier, B., 2004. *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1): 169-174.
- Mirete, S., de Figueras, C.G. and Gonzalez-Pastor, J.E., 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(19): 6001-6011.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T. and Naganuma, T., 2005. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2): 1084-1088.
- Moissl, C., Osman, S., La Duc, M.T., Dekas, A., Brodie, E., DeSantis, T. and Venkateswaran, K., 2007. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3): 509-521.
- More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C. and Madsen, E.L., 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5) : 1572-1580.
- Morimoto, S., Ogawa, N., Hasebe, A. and Fujii, T., 2008. Isolation of effective 3-chlorobenzoate-degraders in soil using community analyses by PCR-DGGE. *Microbes and Environments*, 23(4): 285-292.
- Morozova, D., Wandrey, M., Alawi, M., Zimmer, M., Vieth, A., Zettlitz, M. and Würdemann, H., 2010. Monitoring of the microbial community composition in saline aquifers during CO₂ storage by fluorescence in situ hybridisation. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 4(6): 981-989.
- Moser, D.P., Gihring, T.M., Brockman, F.J., Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., Dollhopf, M.E., Lollar, B.S., Pratt, L.M., Boice, E., Southam, G., Wanger, G., Baker, B.J., Pfiffner, S.M., Lin, L.-H. and Onstott, T.C., 2005. *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8773-8783.
- Muller, D., Simeonova, D.D., Riegel, P., Mangenot, S., Koechler, S., Lièvremon, D., Bertin, P.N. and Lett, M.-C., 2006. *Herminiimonas arsenicoxydans* sp. nov., a metalloresistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8): 1765-1769.
- Mullins, T.D., Britschgi, T.B., Krest, R.L. and Giovannoni, S.J., 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.*, 40(1): 148-158.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3): 695-700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. and Wawer, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular microbial ecology, manual 3.4.4*. Kluwer Academic, pp. 1-23.
- Muyzer, G. and Ramsing, N.B., 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology*, 32(8): 1-9.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1): 127-141.

-N/O-

- Nazina, T.N., Kosareva, I.M., Petrunka, V.V., Savushkina, M.K., Kudriavtsev, E.G., Lebedev, V.A., Ahunov, V.D., Revenko, Y.A., Khafizov, R.R., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. and Ivanov, M.V., 2004. Microbiology of formation waters from the deep repository of liquid radioactive wastes Severnyi. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(1): 97-107.
- Nèble, S., Poulain, S., Barsotti, V., Vesvres, M.-H., Le Marrec, C. and Sergeant C. Direct DNA extraction from old clay samples. *Soumis dans Journal of Microbiological Methods*.
- Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J. and Fry, J.C., 2004. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology*, 6(3): 274-287.

- Ning, J., Liebich, J., Kästner, M., Zhou, J., Schäffer, A. and Burauel, P., 2009. Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5): 983-993.
- Nogi, Y., Kato, C. and Horikoshi, K., 1998. Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 170(5): 331-338.
- Norton, C.F., McGenity, T.J. and Grant, W.D., 1993. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *Journal of General Microbiology*, 139(5): 1077-1081.
- Nour, S.M., Fernandez, M.p., Normand, P. and Cleyet-Marel, J.-C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 511-522.
- Novikova, N.D., 2004. Review of the knowledge of microbial contamination of the russian manned spacecraft. *Microbial Ecology*, 47(2): 127-132.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. and Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178(19): 5636-5643.
- Oborin, A.A., Rubinstein, L.M. and Khmurchik, V.T., 2008. On the concept for the organization of the modern biosphere in the terrestrial subsurface, *Biosphere Origin and Evolution*. Springer US, pp. 203-209.
- Ochman, H., Elwyn, S. and Moran, N.A., 1999. Calibrating bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22): 12638-12643.
- Oger, P.M. and Jebbar, M., 2010. The many ways of coping with pressure. *Research in Microbiology*, 161: 799-809.
- Ogram, A., Sayler, G.S. and Barkay, T., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7(2-3): 57-66.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L. and Mah, R.A., 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 58(1): 27-38.
- Ollivier, B. and Cayol, J.-L., 2005. Fermentive, iron-reducing, and nitrogenreducing microorganisms. In: *Petroleum microbiology*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 71-88.
- Ollivier, B., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M., Patel, B.K.C., Prensier, G. and Garcia, J.-L., 1998. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3): 821-828.
- Onstott, T.C., Moser, D.P., Piffner, S.M., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., Phelps, T.J., White, D.C., Peacock, A., Balkwill, D., Hoover, R., Krumholz, L.R., Borscik, M., Kieft, T.L. and Wilson, R.T., 2003. Indigenous and contaminant microbes in ultradeep mines. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1168-1191.
- Oren, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2): 334-348.
- Oren, A., 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466(1): 61-72.
- Oren, A., 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444): 623-638.
- Orlando, J., Alfaro, M., Bravo, L., Guevara, R. and Carú, M., 2010. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a "desert bloom" event. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(7): 1183-1188.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D. and DeLong, E.F., 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 293(5529): 484-487.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D. and DeLong, E.F., 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2): 700-711.
- Osborne, C.A., Rees, G.N., Bernstein, Y. and Janssen, P.H., 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2): 1270-1278.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Akkermans-van Vliet, W.M., Bogte, J.J. and Stams, A.J.M., 1999. *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2): 345-350.

-P-

- Pace, N.R.**, 1991. Origin of life - Facing up the physical setting. *Cell*, 65: 531-533.
- Parker, M.A.**, 2001. Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent *Bradyrhizobium* Lineages associated with neotropical legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5): 2076-2082.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A. and Wellsbury, P.**, 2000. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal*, 8(1): 11-28.
- Parkes, R.J., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Newberry, C.J., Ferdelman, T.G., Kallmeyer, J., Jørgensen, B.B., Aiello, I.W. and Fry, J.C.**, 2005. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature*, 436: 390-394.
- Pedersen, K.**, 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Reviews*, 34(4): 243-260.
- Pedersen, K.**, 1997. Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 399-414.
- Pedersen, K.**, 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiology Letters*, 185(1): 9-16.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Ekendahl, S. and Hallbeck, L.**, 1996. 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology*, 19(4): 249-262.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Eriksson, S., Hallbeck, A., Hallbeck, L. and Johansson, J.**, 2008. Numbers, biomass and cultivable diversity of microbial populations relate to depth and borehole-specific conditions in groundwater from depths of 4-450 m in Olkiluoto, Finland. *ISME Journal*, 2: 760-775.
- Phelps, T.J., Fliermans, C.B., Garland, T.R., Pfiffner, S.M. and White, D.C.**, 1989. Methods for recovery of deep terrestrial subsurface sediments for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods*, 9(4): 267-279.
- Philippi, G.T.**, 1977. On the depth, time and mechanism of origin of the heavy to medium-gravity naphthenic crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41(1): 33-52.
- Planckaert, M.**, 2005. Oil reservoirs and oil production. In: *Petroleum Microbiology*. ASM, Washington, DC, pp. 3-20.
- Pomerol, C.**, 1974. Le Bassin de Paris. In: J. Debelmas (Editor), *Géologie de France*, Paris, pp. 230-258.
- Pomerol, C.**, 1989. L'évolution du Bassin Parisien. In: A.d.S. français (Editor), *Dynamique et méthodes d'étude des bassins sédimentaires*, Editions Technique, Paris, pp. 165-178.
- Portillo, M. and Gonzalez, J.**, 2008. Microbial communities and immigration in volcanic environments of Canary Islands (Spain). *Naturwissenschaften*, 95(4): 307-315.
- Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J. and Godfroy, A.**, 2007. Continuous enrichment cultures : insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles*, 11(6): 747-757.
- Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C. and Altmann, S.**, 2008. Microbial investigations in Opalinus Clay, an argillaceous formation under evaluation as a potential host rock for a radioactive waste repository. *Geomicrobiology Journal*, 25: 240-249.
- Prescott, L., Harley, J.P. and Klein, D.A.**, 1993. Microbiology, second edition. W.C. Brown Publishers, USA.

-R-

- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. and Chaussod, R.**, 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1111-1120.
- Ranjard, L., Poly, F. and Nazaret, S.**, 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151(3): 167-177.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A. and Nazaret, S.**, 1998. A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *European Journal of Soil Biology*, 34(2): 89-97.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougél, C., Thioulouse, J. and Nazaret, S.**, 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4479-4487.

- Ravenschlag, K., Sahm, K., Pernthaler, J. and Amann, R., 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9): 3982-3989.
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M.-L., Patel, B.K.C., Thomas, P., Garcia, J.-L. and Ollivier, B., 1999. *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3): 1141-1147.
- Ravot, G., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Magot, M. and Garcia, J.L., 1996. Emended description of *Thermosipho africanus* as a carbohydrate-fermenting species using thiosulfate as an electron acceptor. *Int J Syst Bacteriol* 46:321-323
- Rawlings, D.E. and Johnson, D.B., 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153(2): 315-324.
- Rebeix, R., Le Gal La Salle, C., Verdoux, P., Giancesinni, S., Lancelot, J., Michelot, J.-L., Noret, A., Monvoisin, G. and Simler, R., Tracing the origin of water and solute transfers in deep groundwater from Oxfordian, Dogger and Trias formations in the east of the Paris Basin -France. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, In Press, Accepted Manuscript.
- Reed, D.W., Fujita, Y., Delwiche, M.E., Blackwelder, D.B., Sheridan, P.P., Uchida, T. and Colwell, F.S., 2002. Microbial Communities from Methane Hydrate-Bearing Deep Marine Sediments in a Forearc Basin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8): 3759-3770.
- Reysenbach, A.-L., Ehringer, M. and Hershberger, K., 2000. Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the *Aquificales*. *Extremophiles*, 4(1): 61-67.
- Reysenbach, A.-L., Holm, N.G., Hershberger, K., Prieur, D. and Jeanthon, C., 1998. In search of a subsurface biosphere at a slow-spreading ridge. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, Vol. 158
- Roh, C., Villatte, F., Kim, B.G. and Schmid, R.D., 2006. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134: 97-112.
- Röling, W.F.M., Ortega-Lucach, S., Larter, S.R. and Head, I.M., 2006. Acidophilic microbial communities associated with a natural, biodegraded hydrocarbon seepage. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2): 290-299.
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E. and Harry, M., 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18(1): 47-60.
- Ross, N., Villemur, R., Marcandella, É. and Deschênes, L., 2001. Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. *Microbial Ecology*, 42(1): 56-68.
- Roussel, E.G., Sauvadet, A.-L., Chaduteau, C., Fouquet, Y., Charlou, J.-L., Prieur, D. and Cambon Bonavita, M.-A., 2009. Archaeal communities associated with shallow to deep seafloor sediments of the New Caledonia Basin. *Environmental Microbiology*, 11(9): 2446-2462.
- Russell, C.E., 1997. The collection of subsurface samples by mining. *The microbiology of the terrestrial deep subsurface*. Amy, P.S and Haldeman, D.L.

-S-

- Saeki, K., Kunito, T. and Sakai, M., 2010. Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols. *Biology and Fertility of Soils*, 46(5): 531-535.
- Sahl, J.W., Schmidt, R., Swanner, E.D., Mandernack, K.W., Templeton, A.S., Kieft, T.L., Smith, R.L., Sanford, W.E., Callaghan, R.L., Mitton, J.B. and Spear, J.R., 2008. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(1): 143-152.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sammartino, S., Bouchet, A., Prêt, D., Parneix, J.C. and Tevissen, E., 2003. Spatial distribution of porosity and minerals in clay rocks from the Callovo-Oxfordian formation (Meuse/Haute-Marne, Eastern France)-implications on ionic species diffusion and rock sorption capability. *Applied Clay Science*, 23(1-4): 157-166.
- Santelli, C.M., Orcutt, B.N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C.L., Sogin, M.L., Staudigel, H. and Edwards, K.J., 2008. Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature*, 453: 653-656.
- Sass, H. and Cypionka, H., 2004. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(5): 541-548.

- Schäfer, H. and Muyzer, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. In: H.P. John (Editor), *Methods in Microbiology*. Academic Press, pp. 425-468.
- Schippers, A. and Neretin, L.N., 2006. Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1251-1260.
- Schouls, L.M., Schot, C.S. and Jacobs, J.A., 2003. Horizontal Transfer of Segments of the 16S rRNA Genes between Species of the *Streptococcus anginosus* Group. *J. Bacteriol.*, 185(24): 7241-7246.
- Schulz, E., Lüdemann, H.-D. and Jaenicke, D., 1976. High pressure equilibrium studies on the dissociation-association of *E. coli* ribosomes. *FEBS Lett.*, 64: 40-43.
- Scoble, M.J., 2004. Unitary or unified taxonomy? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444): 699-710.
- Simon, C., Wiezer, A., Strittmatter, A.W. and Daniel, R., 2009. Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential Revealed in a Glacier Ice Metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23): 7519-7526.
- Sinclair, J.L. and Ghiorse, W.C., 1989. Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae, and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journal*, 7(1-2): 15-31.
- Skinner, B.J., Porter, S.C. and Botkin, D.B., 1999. The blue planet. An introduction to earth system science. Wiley, New York.
- Spiegelman, D., Whissell, G. and Greer, C.W., 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(5): 355-386.
- Stetter, K.O., Huber, R., Blochl, E., Kurr, M., Eden, R.D., Fielder, M., Cash, H. and Vance, I., 1993. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, 365(6448): 743-745.
- Stevens, T., 1997. Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4): 327-337.
- Stevens, T.O. and McKinley, J.P., 1995. Lithoautotrophic Microbial Ecosystems in Deep Basalt Aquifers. *Science*, 270(5235): 450-455.
- Stevens, T.O. and McKinley, J.P., 2000. Abiotic Controls on H₂ Production from Basalt-Water Reactions and Implications for Aquifer Biogeochemistry. *Environmental Science & Technology*, 34(5): 826-831.
- Stevens, T.O., McKinley, J.P. and Fredrickson, J.K., 1993. Bacteria associated with deep, alkaline, anaerobic groundwaters in Southeast Washington. *Microbial Ecology*, 25(1).
- Stringfellow, W. and Aitken, M., 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1): 357-362.
- Stroes-Gascoyne, S., Schippers, A., Schwyn, B., Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C., Altmann, S., Nagaoka, T., Mauclaire, L., McKenzie, J., Daumas, S., Vinsot, A., Beaucaire, C. and Matray, J.M., 2007. Microbial Community Analysis of Opalinus Clay Drill Core Samples from the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Geomicrobiology Journal*, 24(1): 1-17.
- Stumm, W. and Morgan, J.J., 1996. Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. Wiley-Interscience, New York.
- Su, J., Yang, X., Zhou, Y. and Zheng, T., 2011. Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Biol. Control*, 57(2): 132-138.
- Süß, J., Engelen, B., Cypionka, H. and Sass, H., 2004. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation-dependent methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1): 109-121.
- Summit, M., Peacock, A., Ringelberg, D., White, D.C. and Baross, J.A., 2000. Phospholipid fatty acid-derived microbial biomass and community dynamics in hot, hydrothermally influenced sediments from middle valley, Juan de Fuca ridge, OPD, College station, TX.
- Sunde, E. and Torsvik, T., 2005. Microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. In: *Petroleum microbiology*. ASM, Washington, DC, pp. 201-214.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R. and Stenström, T.A., 1994. Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5): 1810-1813.

-T-

- Tabares, P., Pimentel-Elardo, S., Schirmeister, T., Hünig, T. and Hentschel, U., 2011. Anti-protease and Immunomodulatory activities of bacteria associated with caribbean sponges. *Marine Biotechnology*: 1-10.

- Takai, K. and Horikoshi, K., 2000. *Thermosipho japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles*, 4(1): 9-17.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. and Horikoshi, K., 2001a. Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8): 3618-3629.
- Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C. and Fredrickson, J.K., 2001b. archaeal diversity in waters from deep south african gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(12): 5750-5760.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. and Horikoshi, K., 2008. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31): 10949-10954.
- Taniguchi, A. and Hamasaki, K., 2008. Community structures of actively growing bacteria shift along a north-south transect in the western North Pacific. *Environmental Microbiology*, 10(4): 1007-1017.
- Tanner, M.A., Goebel, B.M., Dojka, M.A. and Pace, N.R., 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(8): 3110-3113.
- Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Patel, B.K.C., Matheron, R. and Caumette, P., 1998. *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2): 333-338.
- Thorseth, I.H., Torsvik, T., Torsvik, V., Daae, F.L. and Pedersen, R.B., 2001. Diversity of life in ocean floor basalt. *Earth and Planetary Science Letters*, 194(1-2): 31-37.
- Thury, M. and Bossart, P., 1999. The Mont Terri rock laboratory, a new international research project in a Mesozoic shale formation, in Switzerland. *Engineering Geology*, 52(3-4): 347-359.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L. and Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13(2): 109-122.
- Tien, C.C., Chao, C.C. and Chao, W.L., 1999. Methods for DNA extraction from various soils: a comparison. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 937-943.
- Tong, X., Chen, F., Yu, J., Hua, S., Asan, C., Luosang, J., Wang, W., Yu, L., Zheng, X. and Wang, J., 2008. Phylogenetic identification and microbial diversity in snow of the summit (8201 m) of Cho Oyu Mountain, Tibet. *Chinese Science Bulletin*, 53(21): 3317-3323.
- Tsai, Y.L. and Olson, B.H., 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4): 1070-1074.

-V/W-

- Van de Peer, Y. and Wachter, R.D., 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.*, 10: 569-570.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M. and Wade, W.G., 2010. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309(1): 1-7.
- Volossiouk, T., Robb, E.J. and Nazar, R.N., 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11): 3972-3976.
- Von Der Weid, I., Korenblum, E., Jurelevicius, D., Rosado, A.S., Dino, R., Sebastian, G.V. and Seldin, L., 2008. Molecular diversity of bacterial communities from subseafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. *Journal Microbiology Biotechnology*, 18(1): 5-14.
- Vreeland, R.H. and Huval, J.H., 1991. Phenotypic characterization of halophilic bacteria from ground water sources in the United States. In: F. Rodriguez-Valera (Editor), *General and Applied Aspects of Micro-Organisms*. Plenum Press, New York, pp. 53-60.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D. and Powers, D.W., 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407: 897-900.
- Wade, B.D. and Garcia-Pichel, F., 2003. Evaluation of DNA extraction methods for molecular analyses of microbial communities in modern calcareous microbialites. *Geomicrobiology Journal*, 20(6): 549-561.
- Wang, J., Ma, T., Zhao, L., Lv, J., Li, G., Zhang, H., Zhao, B., Liang, F. and Liu, R., 2008. Monitoring exogenous and indigenous bacteria by PCR-DGGE technology during the process of microbial enhanced oil recovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(6): 619-628.

- Wang, P., Xiao, X. and Wang, F., 2005. Phylogenetic analysis of Archaea in the deep-sea sediments of west Pacific Warm Pool. *Extremophiles*, 9(3): 209-217.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Trüper, H.G., 1991. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4): 463-464.
- Weber, C.F. and King, G.M., 2010. Distribution and diversity of carbon monoxide-oxidizing bacteria and bulk bacterial communities across a succession gradient on a Hawaiian volcanic deposit. *Environmental Microbiology*, 12(7): 1855-1867.
- Webster, G., Parkes, J.R., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J. and Fry, J.C., 2006. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(1): 65-85.
- Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C. and Weightman, A.J., 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1): 155-164.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2): 697-703.
- Wellsbury, P., Herbert, P.A. and Parkes, R.J., 1996. Bacterial activity and production in near -surface estuarine and freshwater sediments. *FEMS Microbiology*, 19: 203-214
- Weon, H.-Y., Son, J.-A., Yoo, S.-H., Hong, S.-B., Jeon, Y.-A., Kwon, S.-W. and Koo, B.-S., 2009. *Rubellimicrobium aerolatum* sp. nov., isolated from an air sample in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2): 406-410.
- Wery, N., Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F. and Barbier, G., 2002. Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2): 105-114.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12): 6578-6583.
- Widdel, F. and Pfennig, N., 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology*, 129(5): 395-400.
- Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A.C. and Verhoef, J., 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 32(12): 3002-3007.
- Wilhelm, A., Larter, S.R., Head, I., Farrimond, P., Di-Primio, R. and Zwach, C., 2001. Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization. *Nature*, 411: 1034-1037.
- Willerslev, E. and Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proceeding of the royal society B*, 272: 3-16.
- Williams, M.M., Domingo, J.W.S., Meckes, M.C., Keltly, C.A. and Rochon, H.S., 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5): 954-964.
- Wilson, M.S., Herrick, J.B., Jeon, C.O., Hinman, D.E. and Madsen, E.L., 2003. Horizontal Transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(4): 2172-2181.
- Wintzingerode, F.V., Göbel, U.B. and Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3): 213-229.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2): 221-271.
- Woese, C.R. and Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11): 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12): 4576-4579.
- Wolfe-Simon, F., Blum, J.S., Kulp, T.R., Gordon, G.W., Hoefft, S.E., Pett-Ridge, J., Stolz, J.F., Webb, S.M., Weber, P.K., Davies, P.C.W., Anbar, A.D. and Oremland, R.S., 2011. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. *Science*, 332(6034): 1163-1166.

-X/Y-

- Xie, C.-H. and Yokota, A., 2005. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6): 2419-2425.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F. and Ma, Y., 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5): 1643-1646.
- Yamada, T., Suzuki, A., Ueda, H., Ueda, Y., Miyauchi, K. and Endo, G., 2008. Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pre-treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4): 771-781.
- Yamane, K., Maki, H., Nakayama, T., Nakajima, T., Nomura, N., Uchiyama, H. and Kitaoka, M., 2008. Diversity and Similarity of Microbial Communities in Petroleum Crude Oils Produced in Asia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(11): 2831-2839.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*, 208 : 2819-2830
- Yayanos, A.A., Dietz, A.S. and Van Bostel, R., 1982. Dependence of reproduction rate on pressure as a hallmark of deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:1356-1361.
- Yeates, C., Gillings, M., Davison, A., Altavilla, N. and Veal, D., 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1(1): 40-47.
- Yeung, C.W., Woo, M., Lee, K. and Greer, C.W., 2011. Characterization of the bacterial community structure of Sydney Tar Ponds sediment. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(6): 493-503.
- Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K., Yanagida, A., Katsuragi, T., Kanagawa, T., Kurane, R. and Tani, Y., 2005. Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(2): 143-149.
- Yuko, T.-H. and Naoyuki, M., 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes and Environments*, 19(1): 13-19.

-Z-

- Zeng, X., Birrien, J.-L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J., Oger, P., Cambon-Bonavita, M.-A., Xiao, X. and Prieur, D., 2009. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME Journal*, 3(7): 873-876.
- Zhang, G., Dong, H., Xu, Z., Zhao, D. and Zhang, C., 2005. microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from the chinese continental scientific drilling project in China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6): 3213-3227.
- Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T. and Kurane, R., 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2): 743-9.
- Zhang, W., Wang, H., Zhang, R., Yu, X.-Z., Qian, P.-Y. and Wong, M., 2010. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China. *Ecotoxicology*, 19(1): 96-104.
- Zhilina, T.N. and Zavarzin, G.A., 1987. *Methanohalobium evestigatus* n.gen., n.sp. - An extremely halophilic methane-forming archaebacterium (*Methanohalobium evestigatus* n.gen., n.sp.). *Akademiia Nauk SSSR*, 293(2): 464-468.
- Zhou, J., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2): 316-322.
- Zlatkin, I.V., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Forney, L.J., 1996. Diversity among bacteria isolated from the deep subsurface. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17(3): 219-227.
- Zuckerkandl, E., 1987. On the molecular evolutionary clock. *Journal of Molecular Evolution*, 26(1): 34-46.
- Zuckerkandl, E. and Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: V. Bryson and H.J. Vogel (Editors), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, pp. 97-165.
- Zumstein, E., Moletta, R. and Godon, J.-J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2(1): 1462-2920.

Zvyagintseva, I.S., Kostrikina, N.A. and Belyaev, S.S., 1998. Detection of halophilic Archaea in an Upper Devonian oil field in Tatarstan. *Microbiology (Russia)*, 67: 688-691.

Annexes

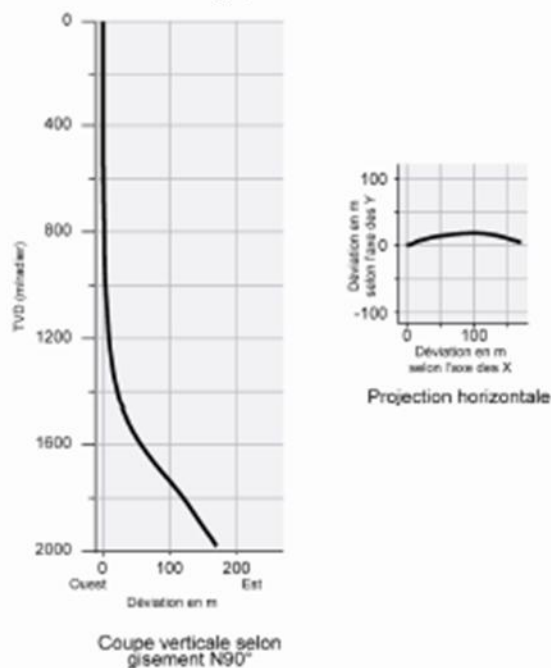
Fiche technique simplifiée de fin de forage de EST433

(document ANDRA, D.RP.OSCA.08.0034)

Photo aérienne du forage EST433



Trajectométrie



Mode de forage	Diamètre de forage	carottage	Trajectométrie	Tests hydro	EST433	Profondeur (m)	Cote (m NGF)	Etage
MDT circulation inverse	12" 1/4	6" 1/2 x 4" - boue à huile	Inclinaison > à 1° jusqu'à 900 m, 5° à 1355 m, 10° à 1740 m, 14.7° à 2000 m. Azimut N74°E à 1000 m, N114°E à 2000 m	Tests entre obturateurs - chambre 10 à 15 m centrée à 670 m et 556 m	Profil	40 - 326.3	111 - 247.3	TITHON
						141 - 217.3	258 - 100.3	KIMM.
						516 - 157.7	544 - 185.7	OXFORDIEN CARBONATE
						691.1 - 332.8	770 - 411.7	CAL - OXF
						790 - 431.7	931.8 - 573.5	DOGGIER CARB.
						1261.9 - 903.4	1896.5 - 1330.2	LIAS
						1742 - 1373.2	1875 - 1500.5	TRIAS SUPERIEUR
						2001 - 1621.7		TRIAS MOY.
								TRIAS INF.

Formulation et rôles des composants de la boue à l'huile

Composants	Formulation	Rôle
Gazole	660 L.m ⁻³	huile de base
Carbovis	10 kg.m ⁻³	viscosifiant
Chaux	25 kg.m ⁻³	saponifiant du Carbotec
Carbotec	20 L.m ⁻³	émulsifiant primaire
Carbomul	10 L.m ⁻³	émulsifiant secondaire
CaCl ₂	70 kg.m ⁻³	Sel de la phase aqueuse
Carbotrol	10 kg.m ⁻³	réducteur de filtrat
Rapport huile/eau	70/30	
Viscosité	8	
Densité	0,98 – 1,10	

La préparation des boues à l'eau étant propre à chaque compagnie de forage, leur formulation exacte ne nous a pas été communiquée. Ce fluide de forage présente une densité de 1,05 et une proportion en eau de 0,97. Il contient essentiellement de la benthonite et de la Béatite (poudre de marbre blanc) comme éléments solides. D'autres composés entrent dans la formulation de cette boue de forage comme la soude, le bicarbonate, un défloculant (Milthin), un stabilisateur de marne (Newdrill), des agents de contrôle de la filtration (Milpac) et divers autres additifs (XC Polymère, Durcal 5, RX03X).

Composition des milieux d'enrichissement

Sauf indication contraire, les composés et solutions utilisés ont été dissous dans de l'eau distillée.

1. Composition des milieux d'enrichissement testés sur les matrices gréseuses profondes

Milieux réalisés au CNAB, Bordeaux (d'après Poulain et al., 2008) :

	AEM1 ^(a)	ANM1 ^(a)	ANM3 ^(a)	ANM4 ^(a)	ANM5 ^(a)
Solution traces ^(b) (mL.L ⁻¹)	10	10	10	10	10
HEPES ^(c) (g.L ⁻¹)	12 ou 1,2	12 ou 1,2	12		
Extrait de levure ^(c) (g.L ⁻¹)	0,4 ou 0,04	0,1 ou 0,01	0,1	0,2	0,2
Peptone ^(c) (g.L ⁻¹)	2 ou 0,2	2 ou 0,2			
Na ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)					2
Cystéine-HCl. H ₂ O (g.L ⁻¹)				0,5	0,5
Résazurine (mg.L ⁻¹)		1		1	1
Glucose ^{(c)(d)} (mM)	10 ou 1	10 ou 1			
AQDS (mM)			5		
Lactate (mM)					10
H ₂ (^d) (bars)				2	
Na ₂ S. 9H ₂ O ^(d) (mM)				2	2
NaHCO ₃ ^(d) (mM)	12	12	12	12	12
NaCl (g.L ⁻¹)	0, 1, 10 et 100		0, 1, 10, 50 et 100		
pH			6,5 - 7,5		

^(a) Basé sur un milieu minéral contenant en gramme par litre d'eau distillée : KH₂PO₄, 0,33 ; CaCl₂. 2H₂O, 0,33 ; NH₄Cl, 0,33 ; KCl, 0,33 et MgCl₂. 6H₂O, 0,33.

^(b) Contient en mg par litre d'eau distillée : FeCl₂. 4H₂O, 1500 (dissous au préalable dans 10 mL d'HCl 25%) ; ZnCl₂, 70 ; MnCl₂. 4H₂O, 100 ; H₃BO₃, 6 ; Na₂MoO₄. 2H₂O, 36 ; NiCl₂. 6H₂O, 24 ; CoCl₂. 6H₂O, 190 et CuCl₂. 2H₂O, 2 (DSMZ, SL-10).

^(c) Utilisé soit à des teneurs élevées pour la préparation des milieux AEM1 et ANM1 « riches », soit à des concentrations faibles pour la préparation de milieux oligotrophes.

^(d) Amendé après stérilisation du milieu

Milieu DSMZ 372:

Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
Casamino-acides	5 g.L ⁻¹
Na-glutamate	1 g.L ⁻¹
KCl	2 g.L ⁻¹
Na ₃ -citrate, 2H ₂ O	3,4 g.L ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	20 g.L ⁻¹
NaCl	200 g.L ⁻¹
FeCl ₂ . 7H ₂ O	36 mg.L ⁻¹
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,36 mg.L ⁻¹

Milieu TSB :

TSB (Tryptone Soy Buffer)	3 g.L ⁻¹
pH ajusté à 7	

pH ajusté entre 6,5 et 7,5

Milieux réalisés au BRGM, Orléans :

Tous les milieux, dont la composition est décrite ci-dessous, contiennent 1 mg.L⁻¹ de résazurine.

	AE ^(a)	F1 ^(a)	L ^(a)	HL ^(a)	HM ^(a)	M ^(a)	F2 ^(b)	B ^(b)	C ^(b)
Solution traces ^(c) (mL.L ⁻¹)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extrait de levure (g.L ⁻¹)	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5
Peptone (g.L ⁻¹)	5	5	0,5	0,5	0,5	0,5	1		
Na ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)			3	3				5	
Cystéine-HCl. H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5			0,5
Glucose ^(e) (mM)	20	20							
Fructose ^(e) (mM)							10		
Lactate (mM)			20					10	
Pyruvate ^(e) (mM)								10	
H ₂ :CO ₂ ^(e) (95 :5) (bars)				2	2				
Méthanol ^(e) (mM)						40			40
Na ₂ S. 9H ₂ O ^(e) (mM)		2	2	2	2	2		1,5	1,5
NaHCO ₃ ^(e) (mM)		20	20	20	20	20	20	20	20
Sels de mer (g.L ⁻¹)			13 et 130						
NaCl ^(d) (g.L ⁻¹)							80 ou 100 ou 200		
pH			7,0 - 7,5				6,5 – 7,0		

^(a) Basé sur un milieu minéral contenant en gramme par litre d'eau distillée : K₂HPO₄, 0,3 ; KH₂PO₄, 0,3 ; NH₄Cl, 1 et résazurine, 1.10⁻³.

^(b) Basé sur un milieu minéral contenant en gramme par litre d'eau distillée : K₂HPO₄, 0,3 ; KH₂PO₄, 0,3 ; NH₄Cl, 1 et résazurine, 1.10⁻³ ; ainsi que du CaCl₂. 2H₂O, du KCl et du MgCl₂. 6H₂O à 0,1 g.L⁻¹ pour les milieux d'enrichissement ciblant les carottes de roches K2-17, 19 et 20 et à 0,5 g.L⁻¹ pour les milieux ciblant K2-18.

^(c) Contient en mg par litre d'eau distillée : FeCl₂. 4H₂O, 1500 (dissous au préalable dans 10 mL d'HCl 25%) ; ZnCl₂, 70 ; MnCl₂. 4H₂O, 100 ; H₃BO₃, 62 ; Na₂MoO₄. 2H₂O, 36 ; NiCl₂. 6H₂O, 24 ; CoCl₂. 6H₂O, 190 et CuCl₂. 2H₂O, 17 (Widdel et Pfennig, 1981).

^(d) 80 g.L⁻¹ de NaCl pour les milieux d'enrichissements destinés à K2-17, 200 g.L⁻¹ dans ceux de K2-18 et 100 g.L⁻¹ pour ceux destinés à K2-19 et K2-20.

^(e) Amendé après stérilisation du milieu

Milieu SS (anaérobie) :

Sels de mer	13 et 130 g.L ⁻¹
Extrait de levure	1 g.L ⁻¹
Na ₂ S, 9H ₂ O	2 mM
pH ajusté à 7	

Milieux EP^(a) (selon modélisation PhreeqC) :

	K2-18	K2-17
Na ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	4,13	6,18
CaCl ₂ (g.L ⁻¹)	2,61	3,70
MgCl ₂ ·6H ₂ O (g.L ⁻¹)	1,24	2,24
NaCl (g.L ⁻¹)	200	85
NaHCO ₃ (g.L ⁻¹)	0,08	0,13
Extrait de levure (g.L ⁻¹)	1	1
pH	6,42	6,86

^(a) Milieux préparés à l'aide d'eau déminéralisée anaérobie sous atmosphère dépourvue d'O₂ et de CO₂ afin de respecter l'anaérobiose des milieux et les valeurs estimées de P_{CO2}.

Milieux réalisés à l'IRD, Marseille :

Les milieux d'enrichissement, cités ci-dessous, ont concerné exclusivement les matrices environnementales K2-18 et K2-20.

	IRD1 ^(a)	IDR2 ^(a)	IRD3 ^(a)	IRD4 ^(a)	IRD 5 ^(a)
Solution traces ^(b) (mL.L ⁻¹)	10	10	10	10	10
Extrait de levure (g.L ⁻¹)	1		0,2		
Peptone (g.L ⁻¹)			5		
Cystéine-HCl, H ₂ O (g.L ⁻¹)		0,5	0,5	0,5	0,5
Résazurine (mg.L ⁻¹)		1	1	1	1
Glucose ^(c) (mM)	20				
Lactate (mM)		20			
Triméthylamine-HCl (g)				5	
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O ^(c) (mM)		20	20		
NaNO ₃ (mM)	20				
H ₂ ^(c) (bars)			2		2
Na ₂ S, 9H ₂ O ^(c) (mM)		2	2	2	2
NaHCO ₃ ^(c) (mM)	24	24	24	24	24
NaCl (g.L ⁻¹)			2, 5, 10, 50 et 200		
pH			7 et 8		

^(a) Basé sur un milieu minéral contenant en gramme par litre d'eau distillée : K₂HPO₄, 0,30 ; KH₂PO₄, 0,30 ; CaCl₂·2H₂O, 0,10 ; NH₄Cl, 1 ; KCl, 0,10 et MgSO₄·7H₂O, 0,2.

^(b) Contient en mg par litre d'eau distillée (pH ajusté à 7 avec KOH) : acide nitrilotriacétique, 1,50 ; MgSO₄·7H₂O, 3 ; MnSO₄·2H₂O, 0,50 ; NaCl, 1 ; FeSO₄·7H₂O, 0,10 ; CoSO₄ ou CoCl₂, 0,10 ; CaCl₂·2H₂O, 0,10 ; ZnSO₄, 0,10 ; CuSO₄·5H₂O, 0,01 ; AlK(SO₄)₂, 0,01 ; H₃BO₃, 0,01 ; NaMoO₄·2H₂O, 0,01. Dissoudre l'acide nitriloacétique avec une solution de KOH jusqu'à atteindre un pH de 6,5 puis ajouter les autres minéraux (Balch et al., 1979).

^(c) Amendé après stérilisation du milieu

2. Composition des milieux d'enrichissement spécifiques testés sur les boues de forage

Milieux AAEM1 et AANM1^(a) :

NH ₄ Cl	0,1 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g.L ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g.L ⁻¹
NaCl	40 g.L ⁻¹
NaHCO ₃	4 g.L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	13 g.L ⁻¹
Peptone	5 g.L ⁻¹
Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
Solution trace 2	2 mL.L ⁻¹
pH ajusté à 11,5	

Solution trace 2 :

EDTA	5 g.L ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 g.L ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	100 mg.L ⁻¹
MnCl ₂	30 mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	100 mg.L ⁻¹
CoCl ₂ . 6H ₂ O	200 mg.L ⁻¹
CuCl ₂ . 2H ₂ O	10 mg.L ⁻¹
NiCl ₂ . 2H ₂ O	20 mg.L ⁻¹
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	1 g.L ⁻¹

^(a) Le milieu AAEM1 est réalisé en condition aérobie alors que le milieu AANM1 est préparé en condition anoxique.

3. Composition des milieux d'enrichissement communs à l'étude de la communauté microbienne contenue dans les boues de forage et celle des bioaérosols

	AEM1 ^(a)	ANM1 ^(a)
Solution traces ^(b) (mL.L ⁻¹)	10	10
HEPES (g.L ⁻¹)	12	12
Extrait de levure ^(c) (g.L ⁻¹)	0,4	0,1
Peptone (g.L ⁻¹)	2	2
Glucose (mM)	10	10
NaHCO ₃ (mM)	12	12
pH	7,0	

^(a) Basé sur un milieu minéral contenant en gramme par litre d'eau distillée : KH₂PO₄, 0,33 ; CaCl₂. 2H₂O, 0,33 ; NH₄Cl, 0,33 ; KCl, 0,33 et MgCl₂. 6H₂O, 0,33.

^(b) Contient en mg par litre d'eau distillée : FeCl₂. 4H₂O, 1500 (dissous au préalable dans 10 mL d'HCl 25%) ; ZnCl₂, 70 ; MnCl₂. 4H₂O, 100 ; H₃BO₃, 6 ; Na₂MoO₄. 2H₂O, 36 ; NiCl₂. 6H₂O, 24 ; CoCl₂. 6H₂O, 190 et CuCl₂. 2H₂O, 2 (DSMZ, SL-10).

Composition des milieux de culture des souches anaérobies

1. Composition des milieux de pré-culture basés sur ceux recommandés par la DSM (tableau 1)

^(c) Contient en mg par litre d'eau distillée : $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1500 (dissous au préalable dans 10 mL d'HCl 25%) ; ZnCl_2 , 70 ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 ; H_3BO_3 , 62 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 36 ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 190 et $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 17 (Widdel et Pfennig, 1981).

^(d) Contient en mg par litre d'eau distillée : pyridoxine-HCl, 100 ; riboflavine, 50 ; thiamine, 50 ; acide nicotinique, 50 ; acide pantothénique, 50 ; acide p-aminobenzoïque, 50 ; acide thiocétique, 50 ; acide folique, 20 ; biotine, 20 et vitamine B₁₂, 1. La solution de vitamines, préalablement dégazée sous N₂, est stérilisée par filtration (0,22 µm) dans un flacon stérile de 50 mL.

2. Composition de base des milieux expérimentaux (tableau 2). La force ionique de ces milieux équivaut à 13 g.L⁻¹ de NaCl

Tableau 1. Composition des milieux de pré-culture basés sur ceux recommandés par la DSM^(a).

Souches (n° des milieux DSMZ)	<i>Methanothermococcus</i> <i>thermolithotrophicus</i> (141)	<i>Methanohalobium</i> <i>evestigatum</i> (375)	<i>Desulfotomaculum</i> <i>geothermicum</i> (406)	<i>Desulfovibrio</i> <i>profundus</i> (383)	<i>Petrotoga</i> <i>mexicana</i> (718)	<i>Thermosipho</i> <i>japonicus</i>^(b)	<i>Thermovirga</i> <i>lienii</i> (383)	<i>Halothermothrix</i> <i>oreonii</i> (761)
NH ₄ Cl (g)	0,25	0,33	0,3	0,3	0,25		0,3	1
K ₂ HPO ₄ (g)	0,14				0,14	0,14		0,3
KH ₂ PO ₄ (g)		0,33	0,2	0,2		0,5	0,2	0,3
KCl (g)	0,335	0,33	0,5	0,5	0,335	0,33	0,5	4
CaCl ₂ · 2H ₂ O (g)	0,14	0,33	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,2
MgCl ₂ · 6H ₂ O (g)	4	0,33	3,1	3	4	4,18	0,3	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O (g)	3,45	4			3,45	3,4		
NiCl ₂ · 6H ₂ O (mg)						0,5		
Solution traces ^(c) (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl (g)	18	250	21	21	18	30	21	100
Extrait de levure (g)	2	0,05			0,2	2	2	
Peptone (g)	2					2	3	0,5
Na-lactate (g)			2,5	2,5	0,2			
Na-formate (g)	1,36							
Glucose (g)					5			10
Triméthylamine- HCl (g)		5						
Na ₂ SO ₄ (g)			3	3				
Cystéine-HCl. H ₂ O (g)	0,5				0,5			
Résazurine (mg)	1	1	1	1	1	1	1	1
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (g)					2			
NaHCO ₃ (g)	5	5	5	2,5	1		2,5	5

Na ₂ S. 9H ₂ O (g)	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2
Na-dithionite (mg)			30				30	10
Na ₂ SeO ₃ . 5H ₂ O (µg)				3		500		
Solution de vitamines ^(d) (mL)	10	10	10	10	10		10	
pH	6,8	7,4	7,2 – 7,4	7,2 – 7,4	6,5 - 6,7	6,3 - 6,5	7,00	7,00

^(a) Composants ajoutés à de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 L. Les éléments qui apparaissent en grisés ont été amendés après stérilisation du milieu.

^(b) Milieu de culture basé sur celui de Takai et Horikoshi (2000).

^(c) et ^(d) sont expliqués dans la page précédente.

Tableau 2. Composition de base des milieux expérimentaux^(a)

Souches	<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	<i>Desulfotomaculum geothermicum</i>	<i>Desulfovibrio profundus</i>	<i>Petrotoga mexicana</i>	<i>Thermosipho japonicus</i>	<i>Thermovirga lienii</i>	<i>Halothermothrix orenii</i>
NH ₄ Cl (g)	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27		0,27	1
K ₂ HPO ₄ (g)	0,1	0,17	0,2	0,09	0,1	0,09	0,2	0,4
KH ₂ PO ₄ (g)	0,05	0,14	0,1	0,09	0,39	0,07	0,1	0,21
KCl (g)	0,33	0,22	0,07		0,33	0,34	0,36	3,72
CaCl ₂ . 2H ₂ O (g)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Cystéine-HCl. H ₂ O (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ . 6H ₂ O (g)	3,9	0,2			3,9	3,9	0,4	2
MgSO ₄ . 7H ₂ O (g)	3,45		3,7	0,5	3,45	3,45		
Solution traces ^(b) (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
K ₂ SO ₄ (g)			0,35	0,6				
NaCl (g)	2,45	8	4,7	5,7		0,4	9,7	4,5
Extrait de levure (g)	2	2			0,2	1	2	0,5

Peptone (g)							3	
Na-lactate (mM)		2,24	2,24	0,2				
Na-formate (g)	1,4							
Glucose (g)				5				10
HCl 1 M	0,7	1	5	0,8	4	6		0,8
Triméthylamine- HCl (g)		5						
Maltose (g)					7,2			
Na ₂ SO ₄ (g)		0,4	2					
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (g)				5	5			
NaHCO ₃ (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solution de vitamines ^(c) (d) (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10
pH	6,8	7,4	7,2 – 7,4	7,2 – 7,4	6,5 - 6,7	6,5	7,00	7,00

(a) Composants ajoutés à de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 L. Les éléments qui apparaissent en grisés ont été amendés après stérilisation du milieu.

(b) Contient en mg par litre d'eau distillée : FeCl₂ · 4H₂O, 1500 (dissous au préalable dans 10 mL d'HCl 25%) ; ZnCl₂, 70 ; MnCl₂ · 4H₂O, 100 ; H₃BO₃, 62 ; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 36 ; NiCl₂ · 6H₂O, 24 ; CoCl₂ · 6H₂O, 190 et CuCl₂ · 2H₂O, 17 (Widdel et Pfennig, 1981).

(c) Contient en mg par litre d'eau distillée : pyridoxine-HCl, 100 ; riboflavine, 50 ; thiamine, 50 ; acide nicotinique, 50 ; acide pantothénique, 50 ; acide p-aminobenzoïque, 50 ; acide thioctique, 50 ; acide folique, 20 ; biotine, 20 et vitamine B₁₂, 1. La solution de vitamines, préalablement dégazée sous N₂, est stérilisée par filtration (0,22 µm) dans un flacon stérile de 50 mL.

Caractérisation des roches du Trias : physico-chimie, minéralogie, porosité

Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur roche totale et sur les lixiviats des quatre roches du trias dans le but de concevoir des milieux de culture proches des conditions in-situ (salinité totale, pH). Les morceaux de roches, issus de la périphérie des carottes, ont été lixiviés en mettant en contact, dans un flacon de 250 mL bouché et scellé sous N₂, 20 g de roche tamisée à 80 µm et 200 mL d'eau ultra pure préalablement dégazée. Cette préparation a été réalisée en BAG. La lixiviation de la poudre de roche a duré 7 jours sous agitation (150 rpm) à 25°C. L'eau en équilibre avec la roche a été filtrée sur 0,45 µm toujours en condition anoxique. Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh) des lixiviats a été mesuré, également en enceinte anaérobie, sans agitation à l'aide d'une électrode (pH meter WTW pH 197i), étalonnée grâce à une solution étalon dont le Eh est égal à +220 mV à 25°C. Le matériel utilisé et les résultats obtenus donnent le potentiel redox par rapport au couple Ag/AgCl (KCl 3 M).

Analyses physico-chimiques

Le tableau ci-dessous présente les analyses (et normes) réalisées pour les quatre échantillons de roches du Trias, sous forme de lixiviats et de roches totales, par le laboratoire d'analyse du service MMA du BRGM Orléans.

Tableau. Analyses chimiques des roches du Trias

Analyses	Normes	Méthodes/Equipements
<i>Lixiviats</i>		
pH	NF T 90-008	Electrode de verre
azote ammoniacal (NH ₄ ⁺)	NF ISO 11732	Analyse en flux (FFA et FIA) couplé à spectrométrie
Alcalinité (CO ₃ /HCO ₃)	NF ISO 9963-1	Potentiométrie
Nitrates	NF ISO 10304	Chromatographie ionique
Chlorures, sulfates, fluorures, bromures, iodures et phosphates	NF T 60-042	Chromatographie ionique
<i>Roche totale</i>		
Chlore	MO008 (protocole BRGM)	Potentiométrie
Sodium	MO009 (protocole BRGM)	Absorption atomique
CEC et cations extractibles	NF X 31.130	Chlorure de cobaltihexamine

Observations de lames minces

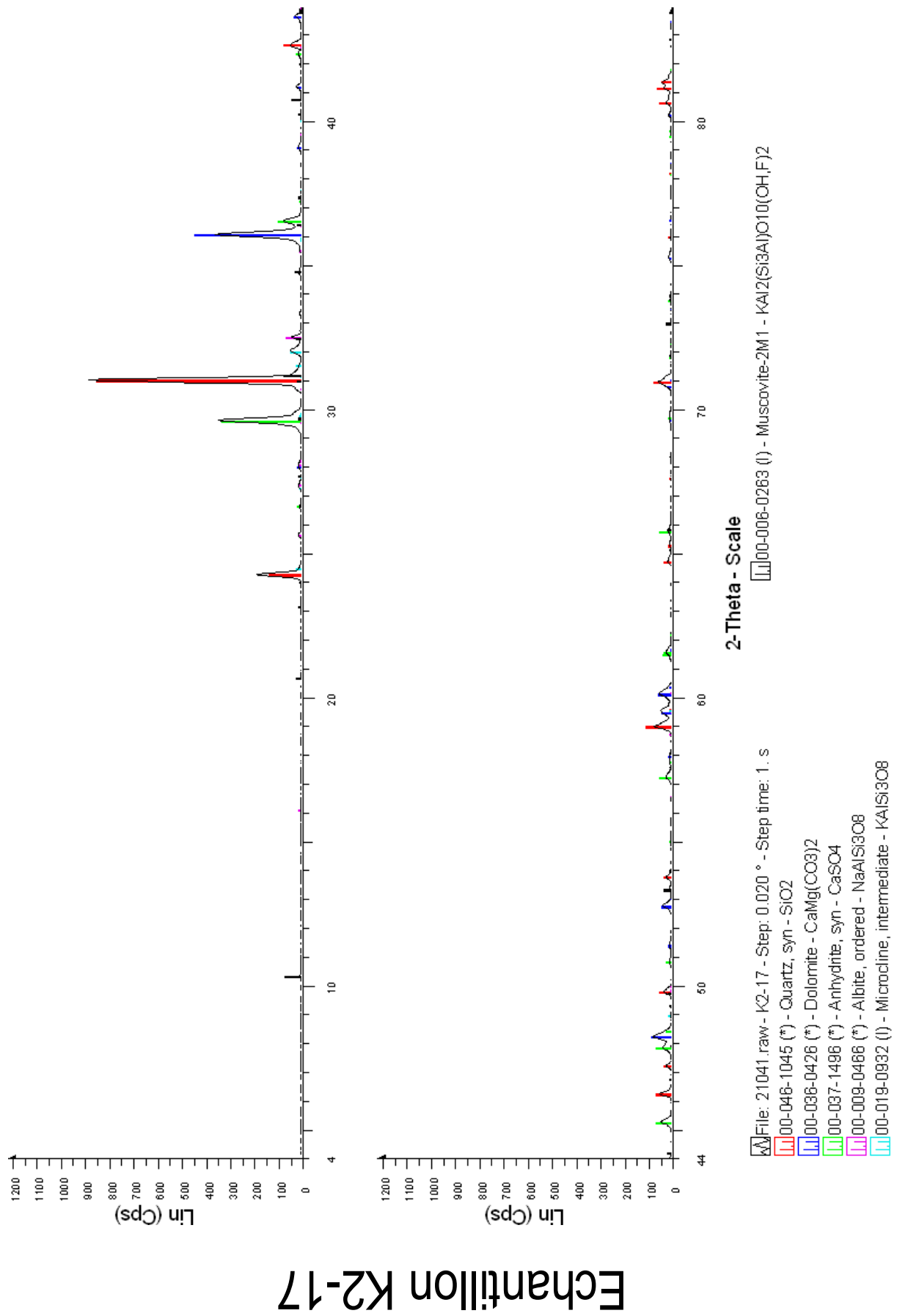
Cette méthode permet l'identification des minéraux constituant une roche grâce à leurs propriétés optiques sous lumière polarisée. Elle permet également de déterminer les relations entre les minéraux, en particulier leur ordre de formation.

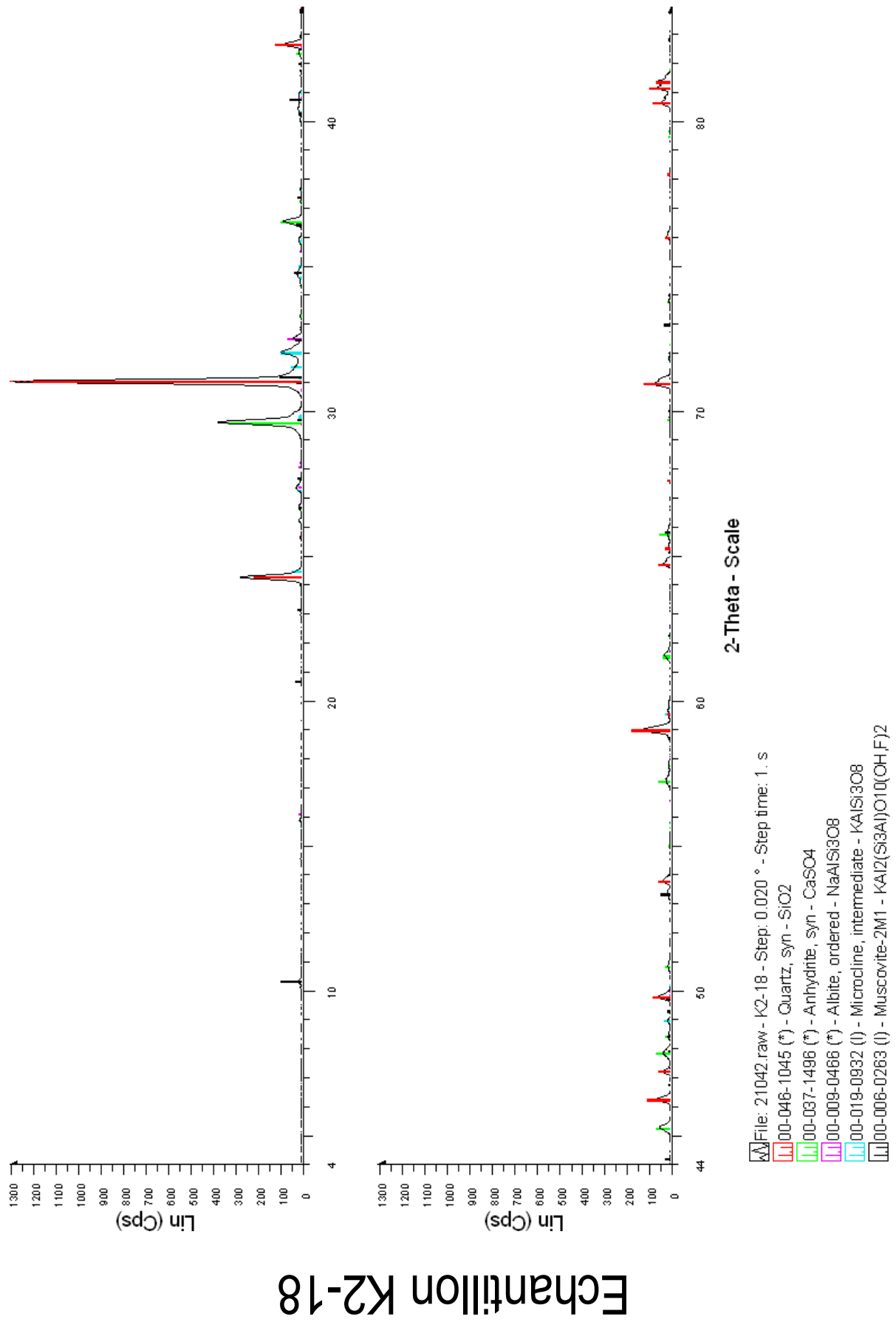
Diffraction de rayons X (DRX) sur poudres

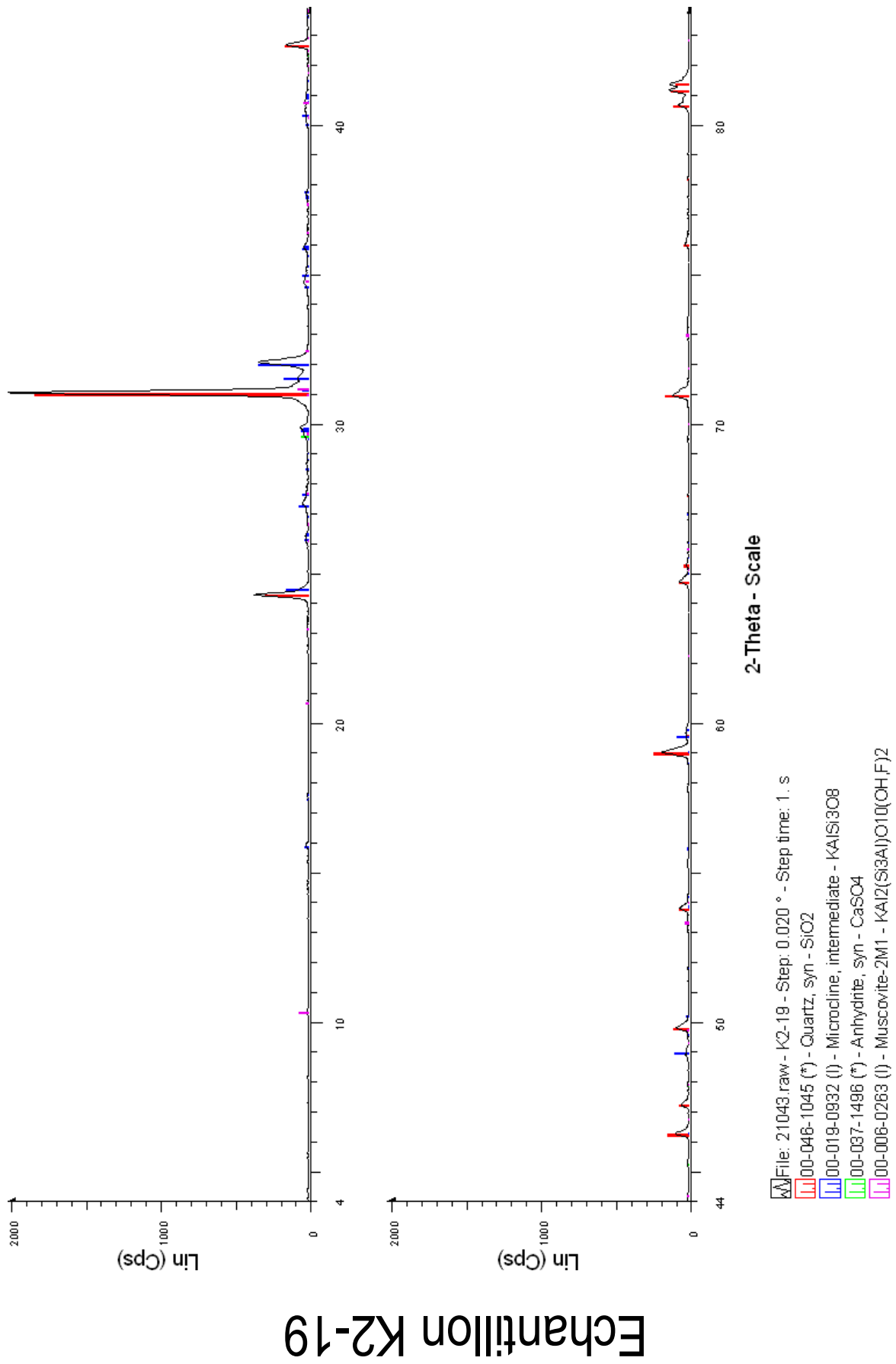
Cette technique permet l'identification des phases cristallisées à partir de leur diagramme de poudre, sous réserve que ces phases existent en quantité supérieure à leur seuil de détection (de l'ordre de 5%). La DRX est essentiellement qualitative et ne peut donner qu'une information semi-quantitative. Le système de diffraction utilisé est constitué d'un diffractomètre SIEMENS D5000 automatisé. Les diagrammes de poudre ont été traités par le logiciel DIFFRAC^{plus}. Les conditions expérimentales appliquées sont les suivantes :

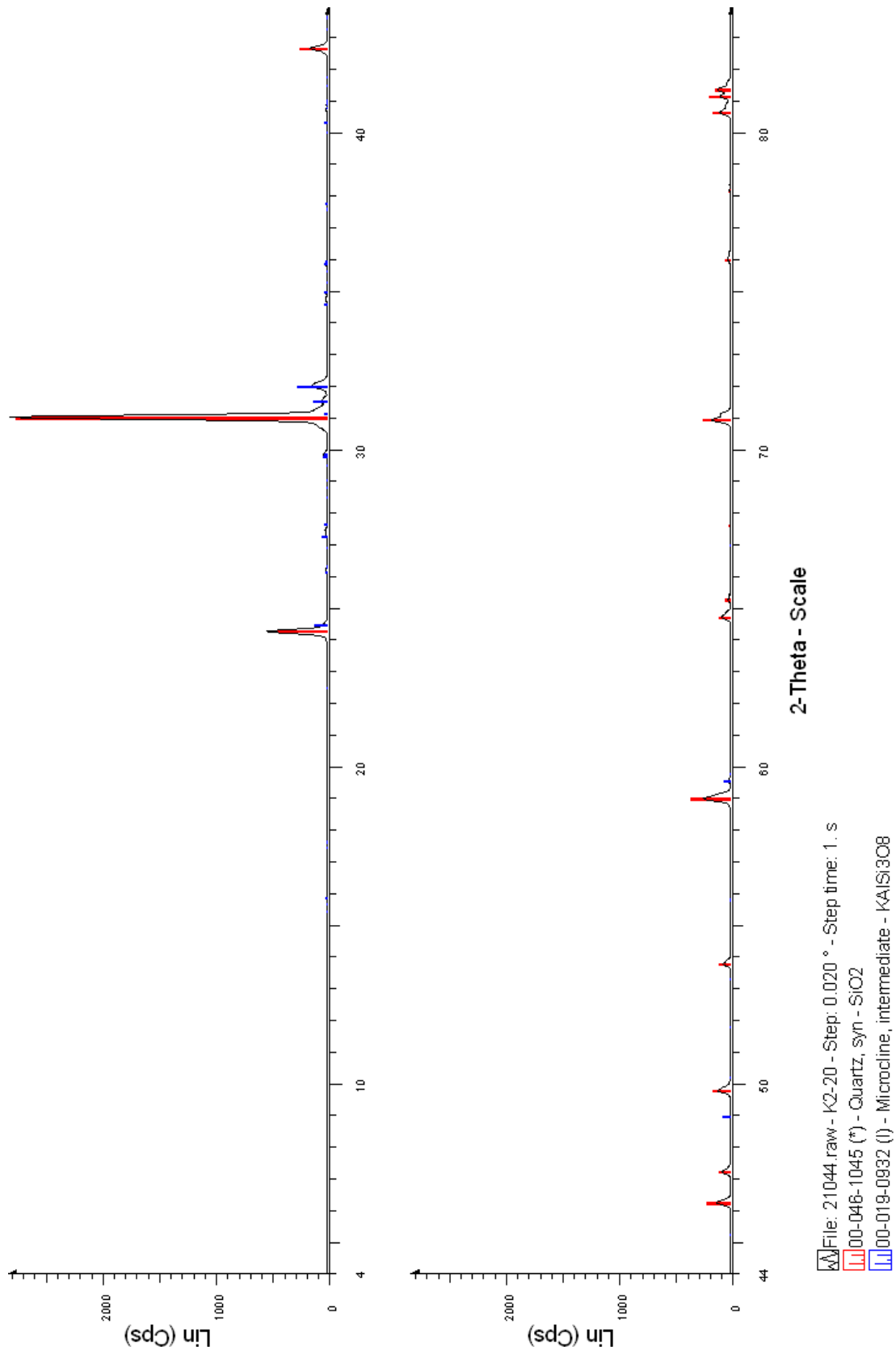
- Balayage de 4 à 84°2 θ pour les poudres,
- Vitesse de balayage de 0,02°2 θ /seconde,
- Temps de comptage : 1 seconde par pas,
- Echantillon tournant pour les poudres,
- Tube au Cobalt (λ K α 1 \approx 1,789 Å).

Les diffractogrammes interprétés obtenus par DRX à partir des échantillons de roche K2-17, K2-18, K2-19 et K2-20 respectivement sont présentés ci-après. Le seuil de détection est de l'ordre de 5%, mais peut largement varier en fonction de la nature des différentes phases.





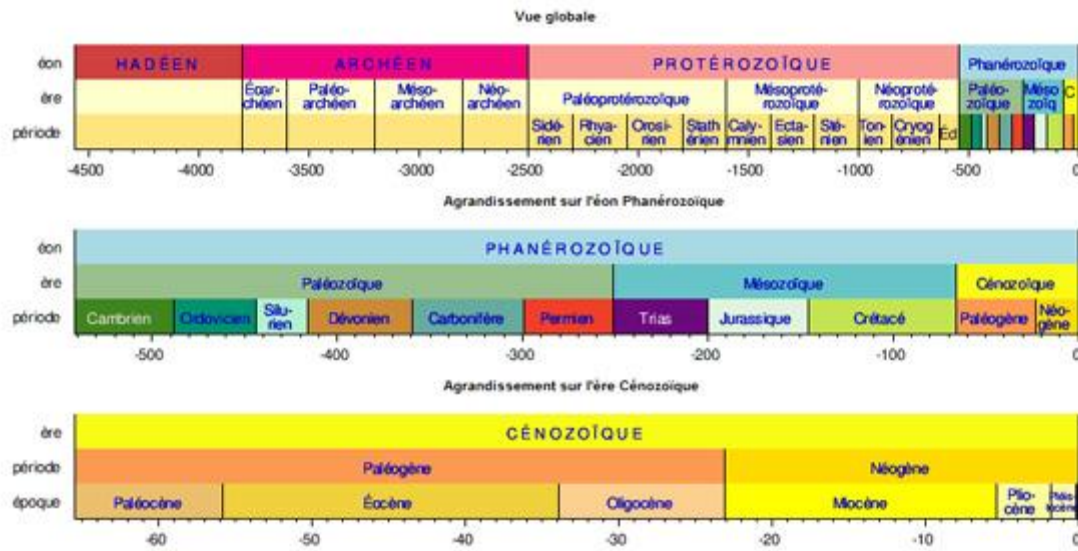




Porosimétrie mercure

Les échantillons ont été séchés pendant 3 à 5 jours à 105°C pour les échantillons de grès grossiers (K2-20 et K2-19) et à 55°C pour les échantillons composés d'une fraction argileuse plus importante (K2-18 et K2-17) afin d'éliminer l'eau libre. Les échantillons de taille pluricentimétrique sont ensuite placés dans une enceinte close, le pénétromètre, qui est dans un premier temps dégazé puis rempli de mercure. Le principe de la porosimétrie au mercure consiste à mesurer le volume de mercure injecté dans l'échantillon en fonction de la pression d'injection augmentée par paliers successifs. Cette technique permet de mesurer la porosité connectée d'un échantillon mais également de calculer la taille de la plus petite ouverture pénétrée par le mercure à chaque palier c'est-à-dire le diamètre poral. L'appareil utilisé (Micrometrics autopore IV 9500 V1.09) est assisté d'un logiciel de pilotage du dispositif qui permet de réaliser les mesures automatiquement en définissant au préalable les paramètres de l'acquisition.

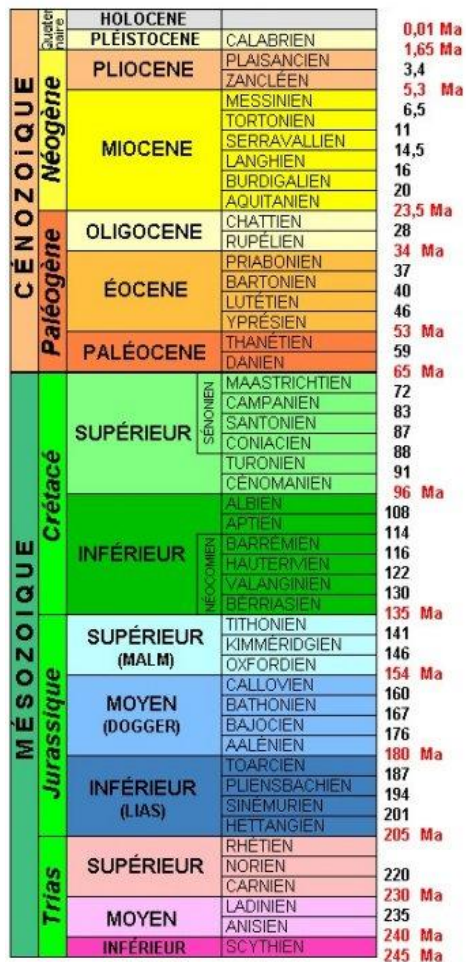
Echelle synoptique linéaire des temps géologiques



Échelle en millions d'années

(<http://www.javade.com/nature/geologie/echelle-des-temps-geologiques/>)

Agrandissement à partir de l'ère Mésozoïque de l'échelle simplifiée des temps géologiques



Ma : millions d'années

http://svtrennes.free.fr/lithotheque/echelle/echelle_temps.jpg

Résumé

Les compartiments géologiques profonds suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique depuis les 50 dernières années. Néanmoins, ces écosystèmes demeurent largement méconnus du fait de leur difficulté d'accès. Le forage profond réalisé par l'ANDRA dans le Bassin parisien en 2008 a offert une opportunité unique de les étudier. Dans ce cadre, cette thèse avait deux objectifs majeurs ; i) caractériser, d'un point de vue microbiologique, quatre formations sédimentaires terrestres triasiques situées entre 1700 et 2000 m de profondeur et ii) étudier les effets combinés des paramètres de température, pression et salinité ainsi que de leur interaction sur l'activité métabolique de procaryotes anaérobies afin de mieux appréhender leur comportement au cours d'un enfouissement géologique.

Malgré la recherche de microorganisme par la réalisation d'une gamme de milieux de culture diversifiée, ciblant préférentiellement les types trophiques fréquemment rencontrés en subsurface (méthanogènes, fermentaires, réducteurs de composés soufrés), aucun microorganisme viable et cultivable n'a été isolé. En parallèle, une approche moléculaire complémentaire, composée (i) de l'étude comparative de l'efficacité de différentes méthodes d'extraction directe d'ADN et (ii) de l'analyse de la diversité bactérienne par la réalisation d'inventaires moléculaires, par DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) et clonage, a été réalisée sur le cœur des carottes de roches, conservées à pression atmosphérique ou sous pression, dans leurs états initiaux et post-incubation. L'exploration de ces formations sédimentaires profondes a indiqué la présence d'une très faible biomasse et d'une biodiversité microbienne pauvre principalement composée de membres aérobies et mésophiles appartenant au domaine *Bacteria*. Cette communauté bactérienne inattendue, également retrouvée dans divers écosystèmes de subsurface ainsi que dans des biotopes extrêmes, pourrait provenir en partie d'une paléo-recharge de l'aquifère du Trias par des eaux froides dérivées de la fonte des glaces formées lors de la dernière glaciation du Pléistocène.

Le second objectif a été abordé à travers l'élaboration d'un plan factoriel complet dans le but d'identifier les tendances des différents effets. Ainsi, les activités métaboliques de huit souches microbiennes halophiles et thermo-tolérantes ont été mesurées dans trente conditions distinctes de température (40, 55 et 70°C), pression (1, 90 et 180 bars) et salinité (13, 50, 110, 180 et 260 g.l⁻¹). Toutes les souches originaires d'environnements profonds se sont révélées être au minimum piézo-tolérantes et capables de maintenir leur activité métabolique sous pressions hydrostatiques. Les métabolismes fermentaires (*T. lienii* et *H. orenii*) et thiosulfato-réducteurs (*P. mexicana* et *T. japonicus*) se sont avérés particulièrement bien adaptés, d'un point de vue métabolique, aux hautes pressions, les plus hautes activités ayant été détectées sous pression. Certaines souches ont montré une résistance accrue aux hautes températures sous pression (*P. mexicana*). Toutefois une résistance variable à la salinité dans les différentes conditions de température et de pression a été observée pour chacune des souches en fonction suggérant que certains mécanismes de résistance contre la pression osmotique seraient également efficaces pour lutter contre les températures et les pressions hydrostatiques élevées.

Etudier les écosystèmes terrestres profonds d'un point de vue microbiologique ne doit pas se restreindre à la recherche et à l'analyse de la diversité présente. L'étude des activités métaboliques de souches de subsurface en conditions profondes ouvre la voie à une meilleure compréhension des rôles joués par les communautés microbiennes en milieu extrême.

Mots clés : environnements terrestres profonds, Trias, extraction directe d'ADN, diversité microbienne, *Bacteria*, DGGE, clonage, plan d'expérience, activité métabolique, température, pression, salinité

Abstract

Over the past 50 years, the scientific community has shown a growing interest for deep geological compartments. However, these ecosystems remain largely unknown due to their inaccessibility. The aim of the present thesis was double; the first aim was to characterize, from a microbiological perspective, four terrestrial Triassic sedimentary formations located between 1700 and 2000 m depth in the Parisian Basin and collected by the ANDRA during a deep drilling campaign in 2008, and the second aim was to study the combined effects of temperature, pressure and salinity on the metabolic activity of anaerobic prokaryotes in order to predict their reaction to geological burial.

Incubations in different media were carried out in order to stimulate the growth of the main trophic types found in such environments such as methanogens, fermenters and sulphate reducing bacteria, however, no viable and cultivable microorganisms could be isolated. In parallel, a molecular approach was used to i) compare the efficacy of several DNA extractions methods and ii) analyse the bacterial diversity, using DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis), and cloning present in rock inner cores conserved either at atmospheric pressure or under pressure, in their initial states and following incubations in various media. The genetic exploration of these samples revealed a very low biomass and a poor diversity composed mainly of aerobic and mesophilic members of the *Bacteria* domain. This unexpected microbial community also found in many subsurface ecosystems as well as in extreme ecosystems could have partially originated from a paleorecharge of the Trias aquifer with cold waters coming from the melting of ice formed during the last Pleistocene glaciation.

The second objective was to study the combined effects of temperature (40, 55 and 70°C), pressure (1, 90 and 180 bars) and salinity (13, 50, 110, 180 and 260 g.l⁻¹) on the metabolic activity of anaerobic prokaryotes. In order to identify trends of the different effects, a complete factorial plan was constructed from the metabolic activities measured for eight halophile and thermo-tolerant bacterial strains exposed to 30 distinct temperature, pressure and salinity conditions. All the strains issued from deep environments were at the least piezo-tolerant and capable of maintaining their activity under hydrostatic pressures. The fermenting (*T. lienii* and *H. orenii*) and thiosulfate reducing strains (*P. mexicana* and *T. japonicus*) were particularly well adapted, from a metabolic point of view, to high pressures; indeed the highest activities were measured under pressure. Also, several strains (such as *P. mexicana*) showed an increased resistance to high temperatures under pressure. However, resistance to an increase in salinity was variable for each strain under the different temperature and pressure conditions. This suggests that the resistance mechanisms for osmotic pressure also enable resistance to high temperatures and hydrostatic pressures.

This work underlines that the microbiological characterization of deep terrestrial ecosystems must not be limited to the search and analyses of the existing diversity. Moreover, such upstream studies of the metabolic activities of subsurface bacterial strains in deep terrestrial conditions are a necessary beginning towards understanding the role of microbial communities in extreme environments.

Keywords: deep terrestrial environments, Trias, DNA extraction methods, microbial diversity, *Bacteria*, DGGE, cloning, experimental plan, metabolic activity, temperature, pressure, salinity